



TESIS DOCTORAL

**EL GEN SUPRESOR DEL TUMOR DE
WILMS (*Wt1*) EN EL DESARROLLO,
HOMEOSTASIS Y REGENERACIÓN
DEL PÁNCREAS**

Laura Ariza Medina

Universidad de Málaga

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias

Directores: Ramón Muñoz-Chápuli y Rita Carmona Mejías

Málaga, 2019



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

EL GEN SUPRESOR DEL TUMOR DE WILMS (WT1) EN EL DESARROLLO, HOMEOSTASIS Y REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS

Laura Ariza Medina


Universidad de Málaga
Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias

Málaga, noviembre de 2019



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Laura Ariza Medina

 <http://orcid.org/0000-0001-6149-0750>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El Dr. Ramón Muñoz-Chápuli Oriol, catedrático del departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga, y la Dra. Rita Carmona Mejías, investigadora postdoctoral del mismo departamento,

ACREDITAN:

Que D^a Laura Ariza Medina, licenciada en Biología, ha realizado bajo la dirección de los abajo firmantes y en el marco del programa de doctorado en Biología Celular y Molecular, las tareas de investigación que han conducido a la elaboración de esta memoria de tesis doctoral.

Para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones legales vigentes, firman esta acreditación.

En Málaga a 18 de noviembre de 2019

Dr. Ramón Muñoz-Chápuli Oriol

Dra. Rita Carmona Mejías

A mis padres y hermano

A Manuela y Alejandra

A Lolo

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Ramón Muñoz-Chápuli Oriol por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en su grupo de investigación. No pude encontrar en mi camino a un jefe mejor, tanto a nivel profesional como personal, ayudándome en todo lo que he necesitado y enseñándome lo emocionante que puede llegar a ser la ciencia.

A la Dra. Rita Carmona Mejías por transmitir esa pasión y ganas en el trabajo. Gracias Ri por haberme ayudado tanto.

A todos mis compañeros del departamento, haciendo especial mención a Mari, Unzu y Mari Tere. Estos años con vosotros han sido maravillosos.

A mis compañeras actuales. Ale, gracias por tus consejos de ya doctora, eres mi compañera de batallas y la mejor ayuda que se ha podido cruzar en mi día a día. Al resto de mis chicas, gracias por aguantar mis “nervios” en el recorrido de la elaboración de esta tesis. Sois geniales.

A mis amigos por darme ánimos para seguir siempre hacia adelante.

Quiero dar las gracias especialmente a mi madre por darme todo el tiempo que he necesitado cuidando de mis hijas. Esto no hubiera sido posible sin tu ayuda.

A mi hermano, Rome y Mayte por aguantarme siempre en todo y darme mi espacio para poder estudiar.

A mi Lolo por tener paciencia conmigo, apoyarme incondicionalmente en cada decisión y huir con las niñas al ver mi estado de “ánimo”.

A mis pequeñas Manuela y Alejandra por haber hecho tan “entretenida” la escritura de la tesis. Habéis sido mi motor.

Y finalmente a ti, papá, gracias por enseñarme los valores más importantes. Esta tesis está dedicada a ti y espero que te sientas muy orgulloso.

ABREVIATURAS

bHLH Factor de transcripción del tipo *basic Helix-Loop-Helix*

BMP Proteína morfogenética de huesos (*bone morphogenetic protein*)

CDEC Células derivadas del epitelio celómico

CDEP Células derivadas del epicardio

CEH Células estrelladas hepáticas

CEP Células estrelladas pancreáticas

FGF Factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*)

GFAP Proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acid protein*)

GFP Proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*)

IGF Factor de crecimiento similar a la insulina (*insulin-like growth factor*)

PBS Solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCNA Antígeno nuclear de células proliferantes (*proliferating cell nuclear antigen*)

PP Polipéptido pancreático

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*)

RA Ácido retinoico (*retinoic acid*)

RALDH2 Retinaldehído deshidrogenasa-2

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa/transcriptasa inversa (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)

SMC Células musculares lisas (*smooth muscle cells*)

TEM Transición epitelio-mesénquima

TGFβ Factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β*)

TME Transición mesénquima-epitelio

Wt1/WT1 Gen supresor del tumor de Wilms/proteína producto del gen *Wt1*

YFP Proteína fluorescente amarilla (*yellow fluorescent protein*)

Esta tesis doctoral ha contado con las siguientes fuentes de financiación:

- MINECO/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (BFU2014-52299-P y BFU2017-83907-P)
- Instituto de Salud Carlos III-Red TerCel (RD12/0019-0022)
- Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PC0066-2017)

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. El gen supresor del tumor de Wilms (<i>Wt1</i>). Características generales	19
1.2. Expresión y funciones del gen del tumor de Wilms en el desarrollo embrionario	21
1.3. Expresión y función del gen del tumor de Wilms en el organismo adulto. Consecuencias de su delección adulta	24
1.4. El páncreas	25
1.5. Enfermedades pancreáticas	27
1.6. Desarrollo embrionario del páncreas	28
1.7. Páncreas endocrino	30
1.8. Páncreas exocrino	31
1.9. Las células estrelladas pancreáticas (CEP)	32
1.10. El epitelio celómico	35
2. OBJETIVOS	37
3. PUBLICACIONES	41
3.1. Publicación 1. <i>Coelomic epithelium-derived cells in visceral morphogenesis</i>	43
3.1.1. Trazado del linaje de las células derivadas del epitelio celómico	43
3.1.2. Las CDEC más estudiadas: las células derivadas de epicardio en el desarrollo cardiaco	44
3.1.3. CDEC y desarrollo pulmonar	46
3.1.4. CDEC y tracto gastrointestinal	46
3.1.5. CDEC y desarrollo hepático	47
3.1.6. CDEC y desarrollo pancreático	47
3.1.7. CDEC y desarrollo del bazo	48
3.1.8. CDEC y desarrollo genitourinario	48

3.1.9. Contribución de las CDEC a otros tejidos	48
3.1.10. CDEC en adultos	49
3.1.11. Conclusiones.....	50
<i>Facsímil de la publicación 1</i>	51

3.2. Publicación 2. *Mesothelial-mesenchymal transitions in*

<i>embryogenesis</i>	67
3.2.1. TEM y TME: Bases de su regulación	68
3.2.2. TEM y TME están implicadas en la formación del mesotelio embrionario	69
3.2.3. El destino de las células derivadas del mesotelio embrionario.....	70
3.2.4. Mesotelio embrionario y asimetría derecha-izquierda	73
3.2.5. TEM en el mesotelio adulto. Implicaciones clínicas	74
3.2.6. Conclusiones	74
<i>Facsímil de la publicación 2</i>	77

3.3. Publicación 3. *Role of the Wilms' tumor suppressor gene Wt1 in*

<i>pancreatic development</i>	85
3.3.1. El mesotelio pancreático expresa WT1 y da lugar a células mesenquimales durante el desarrollo	86
3.3.2. Una gran parte de las células estrelladas pancreáticas deriva del linaje celular que expresa WT1	87
3.3.3. La eliminación de WT1 en el mesotelio provoca un retraso en el crecimiento del páncreas ventral, un mesogastrio defectuoso, una ubicación anormal del páncreas dorsal y una malrotación intestinal..	88
3.3.4. El mesotelio adulto no contribuye a la renovación de la población de las células estrelladas pancreáticas	89
3.3.5. Resumen de la discusión.....	89
<i>Facsímil de la publicación 3</i>	91

3.4. Publicación 4. <i>The Wilms' tumor suppressor gene regulates pancreas homeostasis and repair</i>	101
3.4.1. La expresión de WT1 se restringe al mesotelio pancreático	101
3.4.2. Una parte de la población adulta de CEP deriva de los progenitores que expresan WT1	102
3.4.3. La delección de <i>Wt1</i> causa deterioro del páncreas, pérdida de marcadores de CEP y defectos en el mesotelio	102
3.4.4. La pancreatitis inducida por ceruleína provoca una regulación positiva de WT1 en el mesotelio y la expresión <i>de novo</i> en CEP activadas...	104
3.4.5. La pancreatitis inducida por ceruleína rescata parcialmente a la población de CEP y la organización acinar en ratones con delección condicional de WT1	105
3.4.6. Resumen de la discusión.....	106
<i>Facsímil de la publicación 4</i>	111
4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	131
5. CONCLUSIONES	135
6. BIBLIOGRAFÍA	139

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL gen supresor del tumor de Wilms (*WT1*). Características generales

El tumor de Wilms o nefroblastoma es un cáncer pediátrico, cuyo origen se atribuye a un fallo en la diferenciación de los progenitores renales. Representa el cáncer abdominal más frecuente en niños, con una incidencia de 1/10000 nacimientos vivos (Charlton *et al.*, 2017). Su nombre se debe al médico alemán Max Wilms, quien publicó sus resultados en una monografía en el año 1899. En ella proponía que las células tumorales se originaban debido a un anormal desarrollo embrionario del riñón.

El gen supresor del tumor de Wilms (*Wt1*) fue descubierto por su relación con la aparición de casos de tumor de Wilms, aunque como veremos luego su contribución a esta patología es relativamente menor. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 posición p13 de humanos. La transcripción del gen *Wt1* genera 3 Kb de ARNm que codifican para una proteína dotada de cuatro dedos de zinc de tipo C2H2. El gen *Wt1* consta de 10 exones que dan lugar a la formación de cuatro transcritos principales en mamíferos, a consecuencia de dos eventos de empalme alternativos (Figura 1). El primero de estos eventos se produce entre el dominio amino terminal (rico en prolina) y los dominios de dedos de zinc, y se trata de un segmento correspondiente al exón 5, que codifica para 17 aminoácidos. En un segundo empalme alternativo se puede insertar un motivo de 3 aminoácidos (lisina, treonina y serina, KTS) en el extremo 3' del exón 9 (Hastie, 2001; Hohenstein y Hastie, 2006; Hastie, 2017).

La proteína WT1 puede presentarse en al menos 24 isoformas diferentes en mamíferos, aunque las cuatro principales se distinguen, como ya hemos señalado, por la presencia/ausencia del exón 5 y del motivo KTS entre los dedos de cinc 3 y 4, respectivamente. Las isoformas –KTS actúan sobre todo como reguladores transcripcionales (Toska y Roberts, 2014), mientras que las +KTS intervienen en procesos de empalme alternativo e interacciones proteína-proteína (Hohenstein y Hastie, 2006; Hastie, 2017). La proporción entre las isoformas +KTS/ -KTS se mantiene en aproximadamente 2: 1.5 en condiciones fisiológicas normales.

El gen *Wt1*, dependiendo del contexto, puede comportarse como oncogén o como supresor tumoral, como promotor o inhibidor de proliferación y diferenciación, como factor de supervivencia o promotor de apoptosis. Las distintas funciones desempeñadas por las diferentes isoformas, así como los distintos niveles de intervención de dichas isoformas (transcripcional, postranscripcional e interacciones con otras proteínas) explicarían esta sorprendente complejidad funcional (Hohenstein y Hastie, 2006; Hastie, 2017).

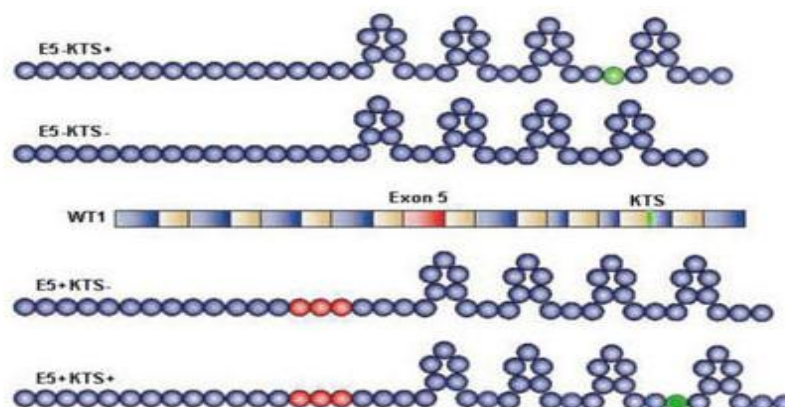


Figura 1. Esquema que muestra en el centro la organización del gen *Wt1* con sus exones en azul. El exón 5 se muestra en rojo y el inserto verde corresponde a la región que da lugar al tripéptido KTS. En la parte superior se muestran las proteínas que carecen del exón 5 y aquellas que sí lo poseen en la parte inferior. Se puede observar las diferentes distancias que hay entre los dedos de Zn^{2+} 3 y 4 a causa de la inserción del motivo KTS. Modificado de Hernández, 2011.

El tumor de Wilms se asocia con mutaciones esporádicas en homocigosis y en heterocigosis en el gen *Wt1* (Gerald, 1994), aunque son varios los genes implicados en el desarrollo de esta enfermedad, por lo que es un modelo de heterogeneidad genética. Estos genes son el propio *Wt1* (que sólo aparece mutado en un 15% de los casos), los genes de predisposición familiar (también variados, comprendiendo como mínimo a otros dos *loci*) y otros genes que muestran alteraciones genéticas y epigénéticas (pérdida de heterocigosidad y pérdida de impronta en tumores) (Huff, 1998; Bahrami et al., 2017).

Como ya se ha señalado, las mutaciones en el *locus Wt1* sólo se detectan en una minoría de casos de tumor de Wilms. Sin embargo, su sobreexpresión en tumores sólidos y leucemias mieloides y linfoides es mucho más significativa (Ariyaratana y Loeb, 2007). De hecho, actualmente se considera a *Wt1* como una de las moléculas más prometedoras en ensayos clínicos de inmunoterapia contra el cáncer (Van Driessche et al, 2012; Hosen et al., 2016; Koido et al., 2016).

Mutaciones en el *locus Wt1* están relacionadas también con los síndromes WAGR, Denys-Drash y Frasier, que incluyen defectos genitourinarios (Hutson et al., 2014). Con estos antecedentes no constituyó ninguna sorpresa el hecho de que la falta de función de *Wt1* en ratones provocara agenesia renal y gonadal, así como defectos cardíacos que causaban la muerte embrionaria (Kreidberg et al., 1993). Los embriones de ratón deficientes en *Wt1* mostraron otros defectos, incluyendo el bazo (Herzer et al., 1999), las glándulas adrenales, el epitelio celómico (Moore et al., 1999), el hígado (Ijpenberg et al., 2007) o el polo venoso cardíaco (Norden et al., 2010).

1.2. Expresión y funciones del gen del tumor de Wilms en el desarrollo embrionario

WT1 se expresa durante el desarrollo embrionario de mamíferos en muchos tejidos, incluidos el sistema urogenital, bazo, médula espinal, diafragma, epitelio celómico y epicardio (Armstrong et al., 1993; Moore et al., 1999; Cano et al., 2016; Ariza et al., 2016; Carmona et al., 2016). Diversos estudios muestran que no hay expresión de ARNm de *Wt1* antes del estadio embrionario 9.5 (E9.5). A partir de este estadio, el ARNm de *Wt1* se localiza en los tejidos pronéfricos y mesonéfricos, en áreas del epitelio celómico y en el proepicardio (tejido progenitor del epicardio) (Rackley et al., 1993, Armstrong et al., 1993). Hacia el estadio E11.5, el cordón nefrogénico, la cresta urogenital y el tejido de condensación metanéfrico muestran intensas señales de la presencia de WT1. Esta expresión se correlaciona con la diferenciación renal entre los días E11.5 y E16.5. Los componentes estromales en la gónada en desarrollo ya muestran expresión de WT1 hacia E10.5, mientras que la expresión de WT1 se extiende a órganos como el bazo, la corteza adrenal y el epitelio celómico, incluyendo al epicardio cardíaco. También se localiza expresión de WT1 en la parte ventral de la médula espinal (Rackley et al., 1993, Armstrong et al., 1993). Tras el nacimiento, la expresión de WT1 se reduce mucho, y se detecta sobre todo en los podocitos glomerulares y en el mesotelio.

En las bases de datos de información genómica se cita la presencia de WT1 en numerosos tejidos embrionarios y adultos. Esta información se puede consultar en los enlaces:

- <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:98968>
- <http://www.informatics.jax.org/tissue/marker/MGI:98968>

El patrón de expresión en embriones humanos (28-70 días) es muy similar al de las etapas equivalentes de ratón (E10-E15), aunque la expresión en el neuroectodermo está menos caracterizada (Ambu et al., 2015). Pueden consultarse en este sentido las referencias recogidas en la base de datos Uniprot:

- <http://www.uniprot.org/uniprot/P19544>

Como se ha mencionado anteriormente, WT1 participa en el desarrollo de diferentes tejidos, incluido el desarrollo temprano del riñón, donde ha sido uno de los primeros factores identificados que regulan la expresión de genes que son fundamentales en las primeras fases de la nefrogénesis (Brodbeck y Englert, 2004). La embriogénesis de los riñones es inducida por una interacción recíproca del mesénquima metanéfrico y la yema uretérica invasora (Nagalakshmi y Yu, 2015). La expresión de WT1 aumenta desde que el mesénquima comienza a condensarse alrededor de las yemas de los brotes uretéricos. Si WT1 no está presente, el mesénquima entra en apoptosis y no se produce la invasión de la yema uretérica (Kreidberg et al., 1993). Esto sugiere que WT1 actúa como un factor de supervivencia para las células progenitoras del riñón. Durante las últimas etapas del desarrollo renal, WT1 puede inhibir la proliferación de células mesenquimales, que se diferenciarán dando lugar a las nefronas maduras (Davies et al., 2004). Hay evidencias que sugieren que WT1 regula la transición mesénquima-epitelio durante el desarrollo normal del riñón, promoviendo la expresión de E-cadherina. Otros estudios han demostrado que WT1 interviene en la vía de señalización de WNT regulando negativamente la señalización canónica por la vía WNT/ β -catenina durante el desarrollo renal (Kispert et al., 1998).

La función de WT1 en el epitelio celómico embrionario contrasta fuertemente con la que desempeña en el desarrollo renal. Diferentes evidencias muestran que WT1 promueve la transición epitelio-mesénquima de este tejido, proporcionando de esta forma células mesenquimáticas a diferentes órganos, como se detalla en dos de las publicaciones que integran esta tesis doctoral (Ariza et al., 2016; Ariza et al., 2018). Esta

función está mediada por el papel de WT1 como represor de E-cadherina. La paradoja de que un mismo factor pueda ser promotor y represor de E-cadherina fue resuelta por el grupo del Profesor Hastie de la Universidad de Edimburgo en 2011. En células renales, WT1 recluta los coactivadores Cbp y p300, mientras que en el epicardio WT1 se asocia al correpresor Basp1. Esto induce cambios opuestos en la cromatina. Estos autores denominaron a este mecanismo como "*chromatin flip-flop*" (Essafi et al., 2011).

Como hemos señalado, las contribuciones de células mesenquimáticas a órganos tales como corazón, pulmones, hígado, páncreas, tracto gastrointestinal, bazo, adrenales, gónadas y riñones van a ser descritas en las revisiones incluidas en esta tesis, y no vamos a detallarlas aquí. Sí es preciso citar que en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de otras funciones de WT1 en tejido neural. Por ejemplo, embriones deficientes en WT1 muestran retinas más delgadas de lo normal. En estos embriones, parte de las células ganglionares retinianas sufren apoptosis, perjudicando el crecimiento del nervio óptico (Wagner et al., 2002). Estos autores sugieren que WT1 regula la expresión del factor de transcripción Pou4f2, crítico para la supervivencia de las células ganglionares retinianas.

De forma similar, WT1 está implicado en el desarrollo del epitelio olfatorio. La pérdida de WT1 en embriones de ratón conlleva la pérdida de progenitores neuronales y el adelgazamiento de dicho epitelio (Wagner et al., 2005). De forma interesante, sólo la variante +KTS es necesaria para esta función, mientras que era la variante -KTS la que estaba implicada en el desarrollo retiniano. Los autores de este trabajo sugieren que son los factores Mash1 y neurogenina1, los que resultan reducidos en ausencia de WT1.

En cuanto a la expresión de WT1 en una subpoblación de neuronas de la médula espinal durante el desarrollo de ratón (la denominada como dl6), se ha mostrado recientemente que este factor es esencial para la coordinación lateral del movimiento de las patas posteriores. El resultado de la delección condicional de WT1 en esta población es una alteración importante de la locomoción, que se hace más lenta y menos coordinada (Schnierwitzki et al., 2018).

1.3. Expresión y función del gen del tumor de Wilms en el organismo adulto.

Consecuencias de su delección adulta

La expresión adulta de WT1 se ha demostrado en los podocitos renales, las células de Sertoli en el testículo, las células de la granulosa en el ovario, algunas células estromales, particularmente en el tejido adiposo blanco (Chau et al., 2012), una pequeña fracción de la médula ósea y el mesotelio (Wilm y Muñoz-Chápuli, 2016).

WT1 es imprescindible para el mantenimiento de los podocitos y su función filtradora (Chau et al., 2011). La reducción de la función de WT1 se asocia a la glomeruloesclerosis (Guo et al., 2002).

La expresión mesotelial de WT1 no es homogénea, y su bajo nivel probablemente ha causado discrepancias entre diferentes estudios (Wilm y Muñoz-Chápuli, 2016). En general la expresión es mayor en el mesotelio de las vísceras abdominales, particularmente en intestino y páncreas, como se menciona más adelante en los resultados de esta tesis.

WT1 es necesario para la función de las células de Sertoli, que es crítica en el mantenimiento de las células germinales y la regulación de la espermatogénesis (Wang et al., 2013; Zheng et al., 2014). Las células de Leydig también resultan afectadas por la deficiencia en WT1, perdiendo su capacidad esteroideogénica (Chen et al., 2014; Wen et al., 2014). En cuanto a las células ováricas de la granulosa, WT1 controla su diferenciación, y en su ausencia la folículoogénesis resulta seriamente afectada (Gao et al., 2014).

Por último, WT1 desempeña un papel todavía no suficientemente conocido en la hematopoyesis adulta humana. Según algunos estudios WT1 se expresa durante la fase de expansión de los progenitores hematopoyéticos, reduciéndose durante su diferenciación (Inoue et al., 1998; Tsuboi et al., 1999; Ariyaratana y Loeb, 2007). En cambio, otros estudios destacan su papel en la diferenciación de granulocitos (Loeb et al., 2003). Estas funciones no parecen estar conservadas en ratón (Hosen et al., 2007). En cualquier caso, está confirmado que WT1 se sobreexpresa en las células malignas del 90% de los pacientes con leucemia aguda mieloblástica, y está mutado en el 10% de dichos pacientes, lo que resalta su importancia en el campo de la oncohematología (Brieger et al., 1994; Menssen et al., 1995).

A partir de la información disponible acerca de la expresión de WT1 en el ratón adulto, resultó una sorpresa el fenotipo resultante de la delección adulta de este gen en el modelo murino inducible $Wt1^{Cre/ERT}$ (Chau et al., 2011), un modelo que hemos utilizado en nuestra tesis doctoral. En un plazo breve de tiempo (9 días), los ratones a los que se les delecionó WT1 manifestaron un fallo multiorgánico que incluía glomeruloesclerosis, atrofia de bazo y páncreas, reducción severa en masa ósea y tejido adiposo, así como anemia eritroblástica. El caso de la glomeruloesclerosis se atribuyó al descenso en la expresión de nefrina (diana de WT1), mientras que la pérdida de hueso y tejido adiposo se relacionó con una reducción sistémica de los niveles de IGF-1. Sin embargo, no se proporcionó en este artículo una explicación a lo que se describió como “severa atrofia pancreática”. Este punto es precisamente uno de los que inspiraron los objetivos de esta tesis, desvelar los mecanismos por los que la delección de WT1 en el ratón adulto afecta de manera tan dramática al páncreas.

1.4. El páncreas

El páncreas humano es un órgano alargado con una longitud de entre 12-20 cm, 2-9 cm de ancho y 2-3 cm de grosor, y un peso de 50-100 g (Figura 2). Está situado en la región retroperitoneal de la cavidad abdominal superior. Se trata de un órgano solitario bien definido que, macroscópicamente, se puede dividir en tres partes principales: la cabeza, el cuerpo y la cola. Algunos autores distinguen dos partes más: el proceso uncinado, ubicado debajo de la arteria mesentérica superior (SMA), y el cuello o istmo, una parte adelgazada situada sobre la SMA. La cabeza del páncreas se encuentra en contacto con la zona duodenal del intestino y la cola limita con el bazo. La mayor cantidad de masa está presente en la cabeza (Heidt et al., 2009; Dolenšek et al., 2015). En otros mamíferos, como el ratón, tiene una estructura algo diferente y se identifica como un tejido rosáceo adyacente al mesenterio que corre a lo largo de la pared intestinal. Macroscópicamente se pueden distinguir en él tres partes principales: la duodenal, la esplénica y el lóbulo gástrico (Dolenšek et al, 2015).

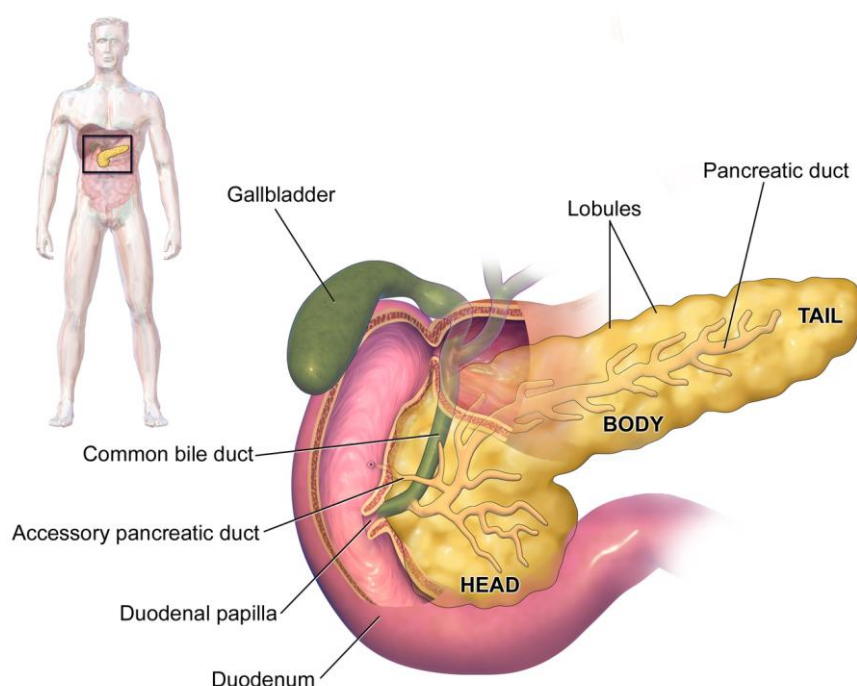


Figura 2. Anatomía del páncreas. Imagen de dominio publico obtenida de Blausen.com staff (2014). "*Medical gallery of Blausen Medical 2014*". DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.

El páncreas es una glándula mixta formada por una región endocrina (con células α , β , PP, δ y ϵ) y otra exocrina (formada por células ductales y acinares) (Figura 3). Las funciones de ambos compartimentos son esenciales para el metabolismo de los nutrientes, ya que facilitan su digestión y la posterior regulación de la homeostasis de glucosa en sangre, respectivamente (Larsen y Grapin-Botton, 2017). El componente exocrino está formado por los acinos pancreáticos que secretan enzimas digestivas al duodeno (Larsen y Grapin-Botton, 2017; Demcollari et al., 2017).

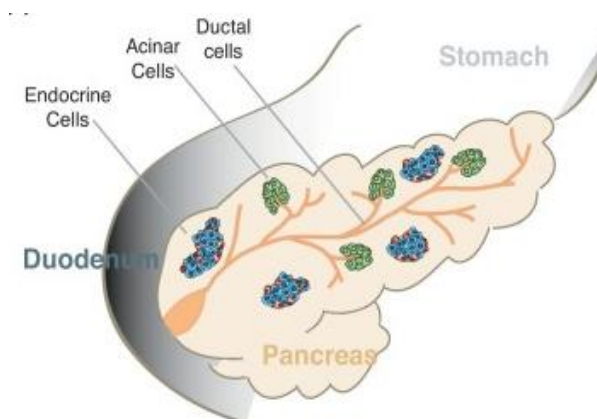


Figura 3. Esquema que muestra los diferentes tipos celulares que componen la región exocrina y endocrina del páncreas. Modificado de Demcollary et al., 2017.

El suministro de sangre arterial al páncreas proviene de dos arterias principales que irrigan los órganos abdominales, las arterias celíaca y mesentérica superior. Debido a la doble irrigación sanguínea, la isquemia al páncreas por obstrucción vascular es poco común. El drenaje venoso del páncreas se realiza a través de la vena esplénica y la vena mesentérica superior, que drena hacia la vena porta. La vena esplénica se extiende a lo largo del cuerpo del páncreas (Pandol, 2010).

En contraste con el dinamismo de las células epidérmicas o de la mucosa intestinal, las células pancreáticas no se renuevan continuamente (Demcollari et al., 2017). El páncreas de los mamíferos tiene un fuerte potencial regenerativo en respuesta a un daño, pero los mecanismos que participan en la reparación del órgano no está claro, y no se sabe hasta qué punto dicho proceso recapitula mecanismos implicados en el desarrollo del páncreas (Jensen et al., 2005; Murtaugh y Keefe, 2015).

1.5. Enfermedades pancreáticas

La inflamación se describe como el conjunto de respuestas complejas y vasculares del sistema inmune a una lesión tisular producida como consecuencia de patógenos u otros estímulos nocivos. La inflamación incita a la red sinérgica de mensajeros químicos para establecer y mantener una respuesta del huésped que está específicamente diseñada para neutralizar agentes infecciosos, eliminar sustancias extrañas y curar el tejido dañado. Los leucocitos se movilizan hacia los sitios de lesión y una familia de citoquinas quimiotácticas modulantes activa las células efectoras,

estableciendo la evolución natural de la respuesta inflamatoria. Sin inflamación, las heridas nunca sanarían (revisado en Greer y Whitcomb, 2009).

La pancreatitis es la inflamación del páncreas y es causada por una serie de factores que incluyen la obstrucción del conducto pancreático, el alcoholismo y la mutación en el gen del tripsinógeno catiónico (PRSS1) (revisado en Manohar et al., 2017). La pancreatitis se representa como pancreatitis aguda con respuestas inflamatorias rápidas, y pancreatitis crónica caracterizada por una marcada formación de estroma con un gran número de granulocitos infiltrantes (como neutrófilos o eosinófilos), monocitos, macrófagos y células estrelladas pancreáticas (CEP) activadas. Estas células estrelladas desempeñan un papel primordial en la pancreatitis, como se mencionará más adelante.

Aproximadamente 70-90% de los casos de pancreatitis crónica son consecuencia del abuso de alcohol, mientras que el resto de los casos se asocian con trastornos genéticos (por ejemplo, pancreatitis hereditaria y fibrosis quística) y causas desconocidas (por ejemplo, pancreatitis idiopática) (Draganov y Frosmark, 2005; Omary et al., 2007). El curso de la pancreatitis crónica se caracteriza por episodios recurrentes de pancreatitis aguda que causan lesión y necrosis del parénquima, con fenómenos crecientes de fibrosis, inflamación crónica y pérdida de células parenquimatosas con cada episodio sucesivo. Las células parenquimatosas tanto en el páncreas exocrino como, en menor medida, en el páncreas endocrino se reducen, y esto conduce a una insuficiencia exocrina irreversible y debilitante, y finalmente a una insuficiencia endocrina que puede ir acompañada de un síndrome de dolor crónico grave (Omary et al., 2007).

1.6. Desarrollo embrionario del páncreas

El páncreas del embrión de mamífero se desarrolla a partir de dos primordios, dorsal y ventral, derivados del endodermo. Estos primordios se expanden, se ramifican y finalmente se fusionan para formar el órgano maduro (Pan y Wright, 2011; Larsen y Grapin-Botton, 2017). En ratón, el primordio dorsal emerge por evaginación del epitelio endodérmico a partir del estadio E9.5. La yema pancreática ventral aparece más tarde, en la etapa E10.5. Las células mesodérmicas espláncnicas inducen el crecimiento y la ramificación de estos brotes. Las células endodérmicas dan lugar a los principales tipos de células pancreáticas, las células acinares exocrinas, las células ductales y las células endocrinas de los islotes de Langerhans (Kim y Hebrok, 2001). Las células

mesodérmicas contribuyen al tejido conectivo y vascular del páncreas, y también a un tipo celular específico, las células estrelladas pancreáticas (CEP) de las que trataremos más adelante.

El páncreas ventral da lugar a la cabeza del órgano, adyacente al duodeno, mientras que el páncreas dorsal da lugar a la cola, unida al bazo. Cada lóbulo contiene una red ductal ramificada que conecta células acinares, organizadas en grupos en el extremo del árbol ductal, al intestino delgado. Aunque estas redes surgen por separado en el desarrollo temprano, están parcialmente interconectadas en el órgano maduro, y el conducto pancreático principal está unido al conducto biliar común antes de entrar en el intestino. Esta última conexión, de hecho, hace que el páncreas exocrino sea vulnerable al daño por obstrucciones de cálculos biliares, una causa importante de pancreatitis aguda (Murtaugh y Keefe, 2015).

La organogénesis del páncreas comprende una interacción coordinada y altamente compleja de eventos de señalización y redes transcripcionales que guían un proceso gradual de desarrollo de órganos desde la especificación temprana del brote hasta el estado final del órgano maduro (Larsen y Grapin-Botton, 2017) (Figura 4).

Las primeras señales procedentes de la notocorda al endodermo inducen la morfogénesis pancreática dorsal e inician y mantienen la expresión de los genes necesarios para el desarrollo del páncreas, incluidos los factores de transcripción con homeodominios PDX1 e ISL1 (Hebrok et al., 1998, 2000; Kim and McDonald, 2002). La expresión de *Sonic hedgehog* (SHH), una potente señal morfogenética, está ausente en el endodermo pancreático, a diferencia de lo que ocurre en otros dominios endodérmicos. La expresión ectópica de SHH en el páncreas de ratón no afecta la citodiferenciación endocrina o exocrina, pero bloquea la morfogénesis adecuada (Apelqvist et al., 1997). Esto sugiere que la represión de la señal SHH es crucial para la morfogénesis del páncreas normal (Hebrok et al., 1998, 2000).

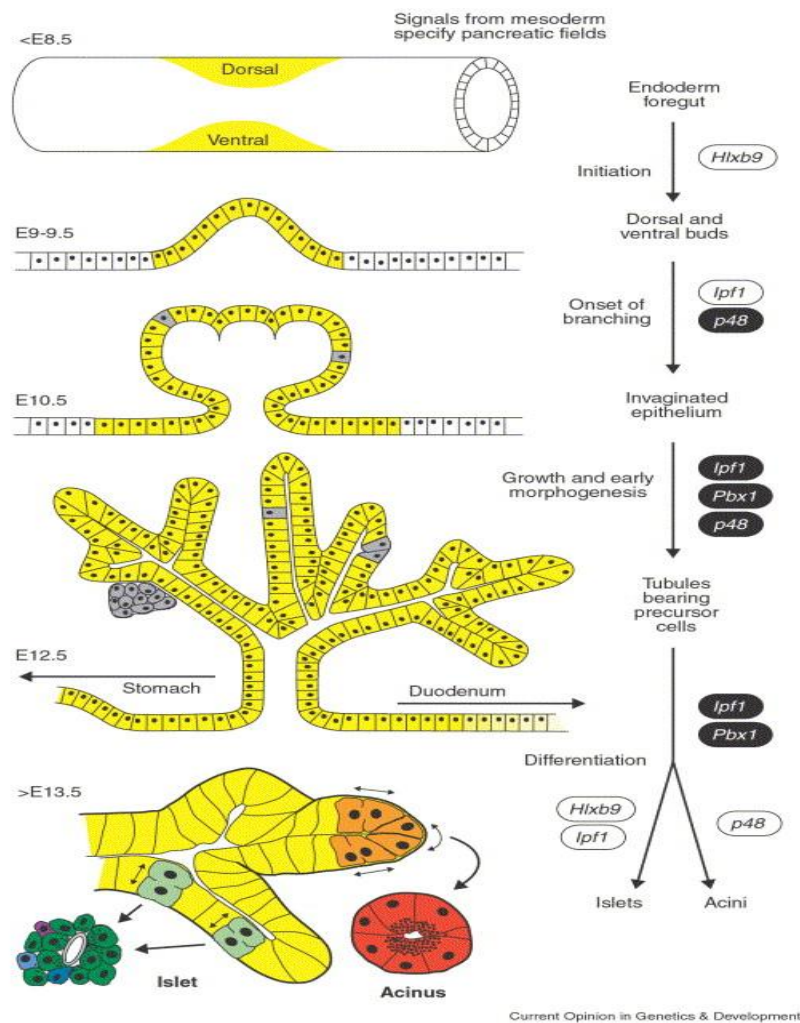


Figura 4. Esquema del desarrollo del páncreas en ratón. Modificado de Kim y McDonald, 2002.

1.7. Páncreas endocrino

La porción endocrina del páncreas ocupa una porción relativamente pequeña (1%-2% de la masa total) (Ballian y Brunicardi, 2007). En el páncreas de los mamíferos, el componente endocrino se compone de células endocrinas dispersas o agrupadas (Lucini et al., 1998). Las células agrupadas (islotes) fueron descritas por primera vez por Langerhans (1869). El páncreas endocrino consiste en numerosos grupos de células localizadas a lo largo de toda la masa pancreática y que contienen tipos celulares específicos responsables de la síntesis y secreción de las hormonas. Los islotes contienen entre unos pocos cientos a varios miles de células endocrinas secretoras de hormonas y se encuentran por todo el páncreas, pero son más abundantes en la región de la cola. El páncreas humano contiene, de media, un millón de islotes que varían en tamaño de 50 a 300 μm de diámetro. Una vaina de tejido conectivo separa cada islote del tejido acinar circundante (Rhoades y Bell, 2012).

Las células endocrinas que forman los islotes se encuentran integradas en una red de capilares especializados que regulan el flujo sanguíneo de los mismos. El suministro de sangre del páncreas endocrino es proporcionado por una a cinco arteriolas por islote, ramificándose en capilares y formando un marco esférico con similitudes estructurales y funcionales a un glomérulo. Este sistema vascular es fundamental para la comunicación intercelular entre las células pancreáticas endocrinas, el tejido pancreático exocrino y otras vísceras (Ballian y Brunicardi, 2007).

Las distribuciones en cuanto al tamaño de los islotes son similares en humanos y en ratones. Se pueden encontrar en los mismos al menos 5 tipos de células endocrinas secretoras de hormonas polipeptídicas. Las más numerosas son las células β que sintetizan y secretan insulina. Éstas constituyen el 50-70% y el 60-80% de las células en islotes en humanos y ratones, respectivamente. Las células α , que contribuyen con 20-40% y 10-20% del número total de células en humanos y ratones, respectivamente, secretan glucagón (Dolenšek et al., 2015). Con menos de un 10% de células en humanos y menos del 5% de células en ratones, se encuentran las células δ , que liberan somatostatina, y las células PP, que liberan polipéptido pancreático (Steiner et al., 2010). Sin embargo, en la cabeza posterior del páncreas humano que es un vestigio del primordio del páncreas ventral, la proporción de células PP entre las células endocrinas es de alrededor del 70%. Por último, se ha identificado una quinta hormona peptídica en el islote humano que es la hormona grelina, producidas por las células ϵ , que representa menos del 1% del total de células (Andralojc et al., 2009).

1.8. Páncreas exocrino

La porción exocrina del páncreas ocupa un 80% de la masa pancreática, secreta enzimas digestivas, agua y NaHCO_3 en el duodeno (Pandol, 2010). Consiste en células organizadas en acinos en los extremos terminales de una elaborada red de estructuras ductales (Figura 5). Las células acinares secretan proenzimas que catalizan la descomposición de carbohidratos, proteínas y lípidos después de su activación proteolítica tras su secreción al duodeno. Las proenzimas secretadas por las células acinares se transportan a través de una red altamente ramificada de células ductales productoras de H_2CO_3 que convergen en conductos secuencialmente mayores, llevando finalmente la secreción del fluido pancreático rico en enzimas a través del conducto pancreático principal de Wirsung y el conducto accesorio de Santorini en el duodeno (Larsen y Grapin-Botton, 2017).

Es importante señalar la relación que existe entre los páncreas endocrino y exocrino. El flujo sanguíneo del páncreas endocrino entra en los capilares del tejido exocrino que rodea cada uno de los islotes antes de entrar a la circulación general. Este sistema “portal” proporciona un suministro de concentraciones elevadas de hormonas desde los islotes de Langerhans al tejido exocrino que rodea a los islotes. Aunque se desconoce la importancia de los efectos de estas hormonas en el páncreas exocrino, las células acinares del páncreas tienen receptores de insulina que participan en la regulación de la síntesis de enzimas digestivas del páncreas exocrino (Pandol, 2010).

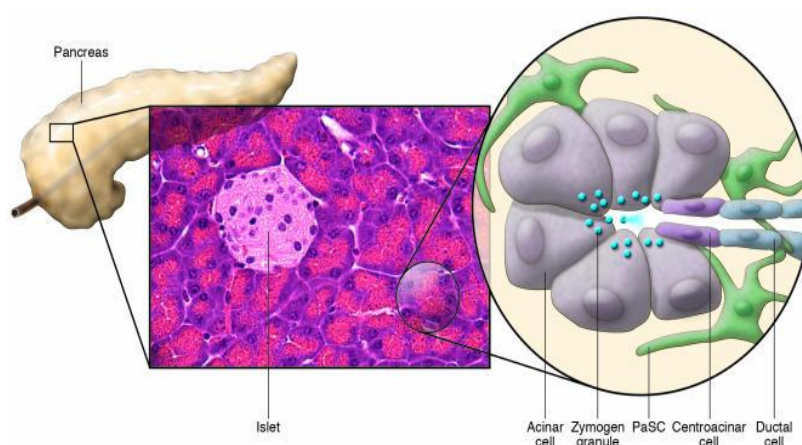


Figura 5. Esquema de los diferentes tipos celulares en el páncreas exocrino. Modificado de Omary et al., 2007.

1.9. Las células estrelladas pancreáticas (CEP)

Las células estrelladas hepáticas (CEH) fueron descritas por primera vez en 1876 por Karl von Kupffer como *Sternzellen* (células estrellas). No volvieron a ser objeto de atención hasta su redescubrimiento en 1971 (Wake, 1971). Su nombre deriva de su forma, caracterizada por finas prolongaciones citoplasmáticas. Más de 100 años después del descubrimiento de las CEH, en 1982, Watari describió por primera vez células equivalentes en el páncreas mediante el uso de autofluorescencia y microscopía electrónica. La autofluorescencia inducida por luz de onda corta es muy útil gracias a la capacidad de las células estrelladas de almacenar retinoides en vesículas lipídicas (Omary et al., 2007; Apte et al., 1998). De hecho, las células estrelladas hepáticas acumulan entre el 50 y el 80% de toda la vitamina A del cuerpo humano en forma de retinil ésteres (revisado en Blaner et al., 2009).

Las células estrelladas pancreáticas (CEP) suponen entre el 4 y el 7% de todas las células del páncreas. Son morfológicamente similares a los fibroblastos, pero se distinguen de ellos gracias a la expresión de marcadores selectivos como desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina y nestina (proteínas intermedias de filamento) y marcadores neuroectodérmicos como el factor de crecimiento nervioso y la molécula de adhesión celular neural (Omary et al., 2007; Apte et al., 2012). Las CEP se localizan sobre todo en el páncreas exocrino, aunque también se encuentran en los islotes de Langerhans (Zha et al., 2014). Son células que poseen un prominente retículo endoplásmico rugoso (Vonlaufen et al., 2010) y una distribución periacinar, basolateral respecto a las células acinares. También se encuentran alrededor de los conductos pancreáticos y de vasos sanguíneos (Apte et al., 1998; Apte et al., 2012).

Si bien el origen mesotelial de las CEP ha sido bien establecido (Ijpenberg et al., 2007; Asahina et al., 2011), no existe información acerca del origen y desarrollo de las CEP, uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

Las CEP quiescentes, en condiciones fisiológicas normales, tienen varias funciones. Están implicadas en la integridad de la estructura acinar mediante interacciones con la matriz extracelular dependientes de la integrina $\beta 1$ (Riopel et al., 2013; Means, 2013). Otras funciones no fibrogénicas de las CEP están relacionadas con el sistema inmune (Bynigeri et al., 2017). Las CEP son capaces de fagocitar neutrófilos polimorfonucleares apoptóticos y células acinares necróticas en la pancreatitis (Tahara et al., 2008). Estas células secretan el neurotransmisor acetilcolina, que actúa sobre los receptores muscarínicos en células acinares para estimular la liberación de enzimas mediada por colecistocinina (Phillips et al., 2010). Las CEP también son capaces de modular la producción de insulina en las células β (revisado en Masamune y Shimosegawa, 2013).

Las CEP ejercen un papel central en el mantenimiento de la renovación periódica de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas (Figura 6). En respuesta a un daño o inflamación del páncreas, las CEP quiescentes se activan por citoquinas, factores de crecimiento, estrés oxidativo o metabólico (revisado en Masamune y Shimosegawa, 2009) y experimentan cambios morfológicos y funcionales para convertirse en células similares a los miofibroblastos, expresando la actina α del músculo liso (α -SMA). Las CEP activadas pierden las vesículas lipídicas, proliferan, migran y producen grandes cantidades de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I, fibronectina y laminina (revisado en Masamune y Shimosegawa 2009; Vonlaufen et al.,

2010). También se ha descrito que las CEP activadas pueden alterar la función endocrina de los islotes en la pancreatitis exocrina e intervienen en la fibrosis de islotes observada en algunos casos de diabetes tipo 2 (Zang et al., 2015).

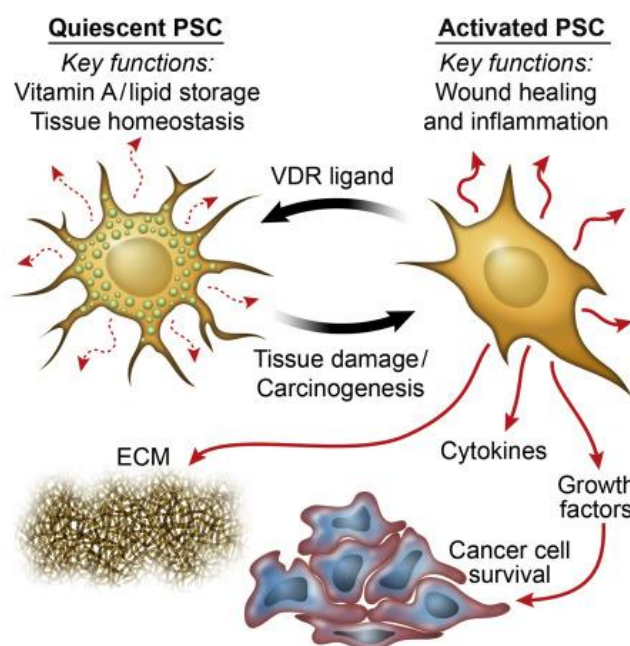


Figura 6. Esquema que muestra las características fundamentales de las CEP quiescentes y activadas. Modificado de Sherman et al., 2014.

Las CEP son capaces ellas mismas de producir citoquinas, lo que puede mantener su activación a través de un bucle autocrino. Estas citoquinas también pueden desempeñar un papel en la atracción de leucocitos durante la inflamación aguda (pancreatitis) (Vonlaufen et al., 2010). Resultados experimentales demuestran que las CEP de rata expresan receptores de lipopolisacárido TLR4 y CD14 y responden a endotoxinas incrementando la producción de matriz extracelular (Vonlaufen et al., 2007).

La activación de las CEP se ve favorecida por factores mitogénicos y fibrogénicos, como el factor de crecimiento transformante β y la proteína Sonic hedgehog. Recíprocamente, las CEP activadas producen factores de crecimiento derivados de plaquetas A y B, factor de crecimiento similar a la insulina 1, factor de crecimiento del tejido conectivo y otros factores que pueden promover la proliferación, supervivencia y migración de células cancerosas (Sherman et al., 2014). De hecho, las CEP se han convertido en los últimos años en un foco de atención por su estrecha relación con el

adenocarcinoma de páncreas, una de las enfermedades oncológicas con peor pronóstico y mayor mortalidad. Se ha demostrado que las CEP interactúan con otros tipos celulares para organizar un microambiente favorable al crecimiento tumoral. Las células tumorales promueven la activación, proliferación, migración, y respuesta angiogénica de las CEP. A su vez, las CEP activan la proliferación y la migración de células cancerígenas, promueven su supervivencia y resistencia a quimioterapia, la transición epitelio-mesénquima, y reducen la respuesta inmune contra el cáncer (revisado en Masamune y Shimosegawa, 2013, 2015).

Por todo lo expuesto, las CEP se han convertido en una diana terapéutica en el tratamiento del adenocarcinoma pancreático, y el conocimiento de los mecanismos que inhiben su activación en un objetivo de primer nivel. En este sentido se ha revelado que los retinoides tienen una gran capacidad de modular la activación de las células estrelladas tanto en hígado como en páncreas (Jaster et al., 2003; McCarroll et al., 2006) ya que se ha demostrado que el ácido retinoico promueve el estado quiescente de las CEP (Froeling et al., 2011). Un mecanismo similar, mediado por el receptor de vitamina D, actúa como un supresor genómico del estado de activación de las CEP, reduciendo la fibrosis y la inflamación en un modelo de pancreatitis murina (Sherman et al., 2014). En esta tesis se ha intentado profundizar en este tema, relacionando la función de WT1, un factor activador de la vía de señalización mediada por ácido retinoico (Guadix et al., 2011), con los fenotipos activado y quiescente de las CEP.

1.10. El epitelio celómico

Epitelio y mesénquima son dos fenotipos celulares básicos durante el desarrollo. Las células epiteliales muestran una polaridad apical-basal, están unidas a las células epiteliales vecinas a través de uniones estrechas y se localizan sobre una membrana basal. En cambio, las células mesenquimales son móviles y similares a fibroblastos, muestran polaridad frontal-posterior y establecen interacciones débiles con otras células sin desarrollar adherencias intercelulares prolongadas. Los fenotipos epitelial y mesenquimático son intercambiables durante el desarrollo. De esta forma las células de un epitelio pueden perder sus adhesiones laterales, degradar la lámina basal y migrar a través de la matriz extracelular en un proceso llamado transición epitelio-mesénquima (TEM). Por otro lado, las células mesenquimáticas pueden establecer adherencias estables entre ellas, segregar una lámina basal y organizar una nueva lámina epitelial. Este proceso inverso se conoce como transición mesénquima-epitelio (TEM) (revisado

en Nieto et al., 2016). Los mecanismos que regulan TEM y TME han atraído la atención de muchos grupos de investigación en los últimos años ya que estos procesos de desarrollo son básicamente los mismos usados por las células tumorales para diseminar y sembrar metástasis lejos del tumor primario (Brabletz et al., 2018). Rondas sucesivas de TEM y TME ocurren durante el desarrollo embrionario de los animales bilaterales, y esto se ha considerado un mecanismo clave para la innovación evolutiva en Metazoos (revisado en Pérez-Pomares y Muñoz-Chápuli, 2002).

Un epitelio mesodérmico, en la mayoría de los animales, recubre la cavidad interna llamada celoma. Esta cavidad facilitó el movimiento de los órganos contráctiles (corazón, intestino) y constituyó una forma primitiva de distribuir nutrientes y homogeneizar el medio interno. Las antiguas clasificaciones taxonómicas dieron un significado filogenético a esta característica y dividieron a los metazoos bilaterales en acelomados, pseudocelomados y celomados. Hoy sabemos que la cavidad celómica ha aparecido y desaparecido en diferentes linajes, que hay varios procesos que conducen a la celomogénesis y también que el origen del mesodermo es diferente en Protóstomos y Deuteróstomos. Sin embargo, en todos los casos, la cavidad celómica está revestida por un epitelio de origen mesodérmico, llamado mesotelio.

El mesotelio embrionario muestra diferencias importantes con el adulto. Por ejemplo, el mesotelio embrionario responde a señales locales que generan células mesenquimáticas a través de un proceso de TEM, expresa un conjunto diferente de genes y muestra la coexpresión de proteínas citoesqueléticas epiteliales y mesenquimales tales como citoqueratinas y vimentina (Pérez-Pomares et al., 1999). De hecho, deberíamos hablar estrictamente sobre el mesotelio sólo cuando las capas de células mesodérmicas esplancnopleurales y somatopleurales que recubren la cavidad celómica expresan E-cadherina en sus adhesiones laterales y cuando se encuentran sobre una membrana basal. Sin embargo, estas características aparecen de una manera altamente dinámica y reversible en el mesotelio embrionario (Thomason et al., 2012). Dado el importante papel desempeñado por el mesotelio embrionario y adulto en el origen del estroma pancreático (incluyendo las CEP), y en la homeostasis del páncreas adulto, trataremos en esta tesis los procesos de TEM que ocurren en dicho mesotelio embrionario y el destino de las células mesenquimáticas generadas en ese proceso.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A partir de los antecedentes descritos en la sección anterior, y teniendo en cuenta los aspectos menos estudiados de los mismos y los objetivos del proyecto de investigación en cuyo marco se ha desarrollado nuestra tesis doctoral¹, nos hemos planteado el abordaje de los siguientes objetivos:

1. Elaborar una revisión actualizada acerca del epitelio celómico embrionario, con especial énfasis en el origen y destino de las células derivadas de dicho epitelio durante el desarrollo.
2. Estudiar el destino de las células derivadas del epitelio celómico del páncreas embrionario, atendiendo en particular al origen de las células estrelladas pancreáticas y a la función del factor de transcripción WT1 en el proceso.
3. Estudiar los mecanismos celulares y moleculares responsables del severo fenotipo pancreático que resulta de la delección adulta del gen *Wt1*.

¹ El gen supresor del tumor de Wilms (Wt1). Regulación de su expresión e implicación en procesos de desarrollo, homeostasis adulta y patofisiología. (proyecto BFU2014-52299-P).

PUBLICACIONES

3. PUBLICACIONES

3.1. Publicación 1

Coelomic epithelium-derived cells in visceral morphogenesis

Células derivadas del epitelio celómico en morfogénesis visceral

Laura Ariza, Rita Carmona, Ana Cañete, Elena Cano, Ramón Muñoz-Chápuli

Developmental Dynamics, 2015 245:307–322. doi: 10.1002/dvdy.24373

Nuestra primera revisión se publicó en una edición especial de *Developmental Dynamics* sobre "Mechanisms of Morphogenesis". Nuestro propósito fue el de revisar los mecanismos por los cuales el epitelio celómico embrionario se activa localmente y da lugar a nuevas poblaciones de células mesodérmicas mediante una transición o transformación epitelio-mesénquima (TEM). En adultos, este epitelio celómico, llamado mesotelio, también desempeña importantes funciones tales como evitar la adherencia entre tejidos y facilitar la lubricación y los movimientos viscerales. El mesotelio adulto también coopera con células del sistema immune y es fuente de citoquinas y factores de crecimiento (Mutsaers y Wilkosz, 2007).

A excepción de algunos trabajos pioneros como el de Gruenwald (Gruenwald, 1942), sólo recientemente se han revelado una serie de funciones específicas del epitelio celómico que son esenciales para la morfogénesis visceral. Como ya hemos dicho, durante el desarrollo este epitelio es muy activo, y es capaz de transformarse localmente en células mesenquimáticas a las que denominaremos células derivadas del epitelio celómico, (CDEC). En nuestra revisión se explican aquellos mecanismos que regulan la TEM del epitelio celómico en diferentes órganos, el potencial de diferenciación de las CDEC, las interacciones moleculares de las CDEC con los tejidos residentes y su contribución global a la morfogénesis de los vertebrados.

A continuación se resumen los diferentes aspectos incluidos en nuestra revisión:

3.1.1. Trazado del linaje de las células derivadas del epitelio celómico

La aparición en las células mesenquimales de agregados de citoqueratina condensada fue usado como un primer marcador transitorio de las células derivadas del epitelio celómico, ya que durante la TEM se produce una sustitución de citoqueratina

por vimentina en los filamentos intermedios (Pérez-Pomares et al., 1997). En los últimos años, sin embargo, ha sido posible trazar más fielmente el linaje de las CDEC gracias a las herramientas genéticas basadas en la tecnología Cre-Lox. Mediante el cruce de ratones con *drivers* específicos del epitelio celómico que promueven la expresión de la Cre recombinasa con líneas reporteras (por ejemplo, ratones R26R^{EYFP}, se consigue la expresión constitutiva del reportero en todo el linaje de células derivadas del epitelio celómico (Mao et al., 1999). Los *drivers* inducibles por tamoxifeno (Cre^{ERT}) permiten además marcar los linajes a partir de un momento determinado del desarrollo (Zhou et al., 2008).

Un punto clave a la hora de trazar el linaje del epitelio celómico embrionario es la elección de un *driver* adecuado. El promotor del gen supresor del tumor de Wilms es de mucha utilidad, siempre que su expresión se restrinja al epitelio celómico, cosa que sucede por ejemplo en el páncreas, como mostramos en otro apartado de esta memoria de tesis, pero no sucede en el corazón (observaciones en vías de publicación). Teniendo en cuenta estas excepciones, los *drivers* Wt1^{Cre} y Wt1^{CreERT} son buenas elecciones para trazar el linaje de la CDEC y han sido frecuentemente usadas (Wilm et al., 2005; Que et al., 2008; del Monte et al., 2011; Wessels et al., 2012; Carmona et al., 2013; Cano et al., 2013). Posibilidades alternativas son la Mesotelina^{Cre} (Rinkevich et al., 2012) o el *enhancer* G2 del gen *Gata4* (Rojas et al., 2005; Delgado et al., 2014; Carmona et al., 2016).

3.1.2. Las CDEC más estudiadas: las células derivadas de epicardio en el desarrollo cardíaco

El corazón, a diferencia de otros órganos, no se recubre de un epitelio celómico (llamado epicardio en el caso del corazón) desde el inicio de su desarrollo. Un primordio extracardíaco, el proepicardio, situado tras el polo cardíaco posterior, genera la primera población de células epicárdicas que migran hacia el corazón. Este proepicardio está compuesto por células epiteliales y mesenquimáticas que se transfieren a la superficie cardiaca por contacto directo o mediante agregados celulares liberados en la cavidad pericárdica (Manner et al., 2001; Carmona et al., 2010).

El epicardio embrionario da lugar a células mesenquimales que son fundamentales para el desarrollo cardíaco. Se ha descrito que esta producción de células mesenquimáticas está controlada por los procesos característicos de la TEM. Sin embargo, el epicardio embrionario no es un epitelio típico. Por ejemplo, sus

filamentos intermedios contienen citoqueratina, pero también vimentina, que es característica de las células mesenquimales (Pérez-Pomares et al., 1997, 1998). También carece de lámina basal en los primeros estadios de su desarrollo. Podemos considerar que la TEM epicárdica es un proceso en dos etapas, que comienza ya en el proepicardio. Las células proepicárdicas con características mesenquimáticas son transferidas a la pared cardíaca y allí una parte de ellas se epitelializa y otra migra para contribuir al tejido vascular y conectivo del corazón. Esto explicaría, por ejemplo, por qué el factor Snail es dispensable para la TEM epicárdica (Casanova et al., 2013). A pesar de estas peculiaridades, la TEM epicárdica muestra muchas de las características específicas de las TEM. Por ejemplo el factor de transcripción WT1 se expresa en proepicardio y epicardio, y es necesario para la TEM epicárdica (Martínez-Estrada et al., 2010), ya que actúa como activador de Snail y represor de la molécula de adhesión epitelial E-cadherina. WT1 también regula la TEM epicárdica modulando la vía canónica de Wnt/ β -catenina y la señalización por ácido retinoico (RA) (von Gise et al., 2011). WT1 es un activador transcripcional de RALDH2, la principal enzima en la ruta de síntesis de RA (Guadix et al., 2011). De hecho la delección condicional del receptor RXR α en el epicardio embrionario altera la TEM y causa anomalías en el desarrollo coronario (Merki et al., 2005).

Una cuestión importante que permanece poco conocida es el mecanismo que estabiliza el epicardio embrionario y termina la TEM. Es probable que la interacción de la molécula de adhesión VCAM en el miocardio con la integrina $\alpha 4\beta 1$ del epicardio participe en esta estabilización (Dettman et al., 2003), inhibiendo probablemente cambios citosqueléticos (Dokic y Dettman, 2006) y el control de la actividad RhoA/Rho quinasa (Artamonov et al., 2015).

En cuanto al destino de las células derivadas del epicardio embrionario (a las que llamaremos CDEP, un subtipo especial de las CDEC), existen numerosos estudios que las relacionan con el origen de los fibroblastos cardíacos y con el músculo liso de los vasos coronarios (Dettman et al., 1998; Vrancken Peeters et al., 1999). La contribución de las CDEP al endotelio coronario es más controvertida, en nuestra revisión mencionamos un trabajo previo de nuestro grupo en el que cifrábamos dicha contribución en torno al 20% (Cano et al., 2016). Sin embargo, datos más recientes rebajan esta cifra al 4% (datos no publicados). Otra controversia se refiere a la diferenciación de cardiomiocitos a partir de CDEP, sugerida en algunos trabajos (Cai et al., 2008; Zhou et al., 2008) y puesta en duda por otros (Rudat y Kispert, 2012).

Mencionaremos por último que las CDEP no sólo contribuyen a diferentes poblaciones celulares cardíacas, sino que tanto ellas como el epicardio interactúan con el miocardio embrionario promoviendo su desarrollo y diferenciación. Mediadores de esta interacción son IGF2 (Li et al., 2011), la eritropoyetina y varios miembros de la familia de los FGFs. En todos los casos, la producción de estos factores es dependiente de la señalización por RA (Kubalak and Sucov, 1999; Brade et al., 2011).

3.1.3. CDEC y desarrollo pulmonar

Las yemas pulmonares aparecen alrededor del día 9,5 en el desarrollo del ratón y del día 28 en el humano. Desde el principio estas yemas están recubiertas por un epitelio celómico embrionario que desempeña un importante papel señalizador, imprescindible para el crecimiento y organización del tejido pulmonar. Estas señales pertenecen a las familias de los factores de crecimiento de tipo FGF, TGF, BMP y EGF (factor de crecimiento epidérmico), así como a las vías Hedgehog y Wnt (Dickman et al., 1997; Malpel et al., 2000; Wells and Melton, 2000; Bragg et al., 2001; Colvin et al., 2001; Weaver et al., 2003; White et al., 2006; Rawlins, 2011).

Además de esta función, el epitelio celómico del pulmón también produce CDEC que invaden las yemas pulmonares. El destino de estas células es el músculo liso vascular y una parte de los fibroblastos pulmonares (Que et al., 2008). Esto fue confirmado por otros grupos utilizando diferentes marcadores (Rinkevich et al., 2012; Dixit et al., 2013). Nuestro grupo realizó un estudio más exhaustivo mostrando que las CDEC pulmonares contribuían además al músculo liso de las vías respiratorias, a una pequeña fracción del endotelio pulmonar (alrededor del 3%) y al cartílago bronquial (Cano et al., 2013). Los defectos observados en los pulmones del ratón deficiente en *Wt1* probablemente son más debidos a alteraciones en las paredes de la cavidad pleural que a defectos en las CDEC (Cano et al., 2013).

3.1.4. CDEC y tracto gastrointestinal

Todo el tracto digestivo está recubierto de un epitelio celómico desde el comienzo del desarrollo, pero hasta hace poco tiempo no se había considerado la posibilidad de que dicho epitelio experimentara un proceso de TEM generador de células mesenquimáticas que se integran en el mesodermo esplancnopleural. Este proceso fue puesto de manifiesto por primera vez usando el modelo *WT1^{Cre}* de trazado de linaje y marcaje directo con fluorocromos (Wilm et al., 2005). Estos autores mostraron que las

CDEC participan en la diferenciación de la musculatura lisa intestinal. Más recientemente nuestro grupo, usando una línea diferente de ratón también basado en un *driver* WT1, mostraron una capacidad de diferenciación mucho más amplia, incluyendo endotelio, músculo liso intestinal y una parte de las células intersticiales de Cajal (Carmona et al., 2013).

3.1.5. CDEC y desarrollo hepático

El hígado se forma por expansión del epitelio endodérmico en el mesénquima del septo transversal. El papel inductor de dicho mesénquima en este proceso es bien conocido (Zaret, 2002; Si-Tayeb et al., 2010). El mesénquima que queda entre los hepatoblastos y las células biliares termina diferenciándose en el endotelio de los sinusoides y en las células estrelladas, entre otros tipos celulares. El hígado queda recubierto en su desarrollo por el epitelio celómico del septo transversal. En un trabajo pionero, nuestro grupo mostró, mediante marcaje directo de embriones de pollo, que células derivadas del epitelio celómico participaban en el revestimiento sinusoidal del hígado (Pérez-Pomares et al., 2004). Cuando fue posible disponer de modelos transgénicos de ratón se pudo confirmar que tanto una parte del endotelio hepático como de las células estrelladas tenía un origen en las CDEC, y que el factor WT1 era indispensable para la TEM del epitelio celómico (IJpenberg et al., 2007). Esto se confirmó más tarde con un modelo inducible WT1^{CreETR2} (Asahina et al., 2011). Como en el caso de corazón y pulmones, el epitelio celómico también tiene una función señalizadora para el desarrollo hepático, mediante la secreción de midkina, pleiotropina y factor de crecimiento hepatocítico (Onitsuka et al., 2010).

3.1.6. CDEC y desarrollo pancreático

En nuestra revisión describíamos que el primordio pancreático, primero doble y luego sencillo por fusión de las yemas dorsal y ventral, está cubierto de un epitelio celómico. También mencionábamos que no se tenían datos acerca de la producción de CDEC por un proceso de TEM, e insistíamos en la necesidad de llevar a cabo investigaciones a este respecto. Precisamente esta ha sido uno de nuestros objetivos en el transcurso de esta tesis doctoral y ha dado lugar a una publicación incluida en esta memoria, en la que se revela que, efectivamente, las CDEC tienen un papel muy importante en la constitución de la población de células estrelladas del páncreas (Ariza et al., 2018).

3.1.7. CDEC y desarrollo del bazo

La formación de CDEC en el caso del bazo no ha sido demostrada. Es interesante porque la propia formación de esta víscera está muy relacionada con la placa esplácnica, un engrosamiento del epitelio celómico que se localiza a ambos lados del intestino anterior. En el curso del desarrollo normal, la placa del lado derecho desaparece, y la placa izquierda se considera promotora del desarrollo del bazo, estimulando la proliferación y diferenciación del mesénquima subyacente (Brendolan et al., 2007). De nuevo WT1 desempeña un papel esencial en el proceso, y de hecho los ratones deficientes para este gen muestran una agenesia completa del bazo debida a la apoptosis del mesénquima (Herzer et al., 1999). Futuros estudios serán necesarios para conocer la presencia y eventual destino de las CDEC en el bazo.

3.1.8. CDEC y desarrollo genitourinario

Las dos crestas derivadas del mesodermo intermedio (renal y genital) forman dos resaltes del epitelio celómico dorsal a la cavidad abdominal. La expresión de genes relacionados con ambos sistemas (excretor y reproductor) se produce regularmente primero en el epitelio celómico de las crestas y luego en el mesénquima subyacente, lo que sugiere un proceso de delaminación de las mismas. Esto ocurre por ejemplo con el factor esteroideogénico, que se expresa en una región definida de las crestas y continúa en el estroma corticoadrenal, células de Sertoli y Leydig del testículo y células de la granulosa en ovario (Hatano et al., 1996). Lo mismo ocurre con el propio WT1, con su diana *Raldh2* y con *Osr1* (Bohnenpoll et al., 2013). Más evidencia del origen celómico de células de Sertoli, Leydig y granulosa han sido aportadas por otros autores (Karl and Capel, 1998; Kusaka et al. 2010; Mork et al., 2012). Las CDEC también contribuyen al conducto de Müller y al componente mesenquimático del canal uterovaginal que origina el músculo liso del útero (Guioli et al., 2007). En cambio la contribución de CDEC al mesénquima renal o a los canales de Wolff es probablemente nula o muy escasa (Shaw and Renfree, 2014).

3.1.9. Contribución de las CDEC a otros tejidos

Hasta ahora hemos visto que las CDEC participan en la formación de tejido vascular y conectivo de diferentes órganos, así como en determinados tipos celulares específicos de órganos (células estrelladas, de Cajal, Sertoli, etc.). Usando un *driver*

mesotelina^{Cre}, Rinkevich et al. (2012) mostraron que el epitelio celómico embrionario contribuye al músculo liso de la aorta a nivel del tronco, algo que nuestro grupo ya había mostrado en embriones de pollo (Pérez-Pomares et al., 1999). El compartimento estromal del timo también tiene una población de CDEC. En nuestra revisión avanzábamos que el mesénquima de los pliegues pleuroperitoneales, esenciales para la formación del diafragma, también tenía un componente importante de CDEC. Esto dio lugar a una publicación posterior por parte de nuestro grupo (Carmona et al., 2016). Por último podemos resaltar la participación de CDEC en el desarrollo del tejido adiposo visceral (Chau et al., 2014) y de la yema de los miembros (Gros y Tabin, 2014).

3.1.10. CDEC en adultos

Nuestro artículo finalizaba con una revisión de la información disponible acerca de las evidencias de que el epitelio celómico adulto también sea capaz de generar células mesenquimáticas mediante una TEM, bien en condiciones fisiológicas o bien en circunstancias patológicas. Es bien conocido el caso de la TEM inducida en el mesotelio peritoneal por la diálisis (Yáñez-Mó et al., 2003; Yang et al., 2003). Por otro lado un proceso neoplásico del mesotelio puede originar diferenciación ósea o cartilaginosa (Donna and Betta, 1986; Yousem and Hochholzer, 1987; Andrion et al., 1989; Kiyozuka et al., 1999), algo que sucede incluso sin transformación neoplásica (Fadare et al., 2002). En condiciones normales ha sido descrito que el epicardio adulto en cultivo puede experimentar TEM y adoptar características de músculo liso (Wada et al., 2003; van Tuyn et al., 2007). Esto ocurre también con explantes de mesotelio peritoneal (Compton et al., 2006; Kawaguchi et al., 2007).

La importante función señalizadora del epitelio celómico embrionario también podría estar conservada en adultos. Tanto el cocultivo de epicardio adulto de rata con cardiomiocitos, como el cultivo con medio condicionado muestran un efecto protector sobre el miocardio (Eid et al., 1992; Zhou et al., 2011). Después de un infarto de miocardio, las células epicárdicas migran dentro de la pared cardiaca y adquieren propiedades de células mesenquimales en un proceso que imita la TEM embrionaria (van Tuyn et al., 2007; Gittenberger-de Groot et al., 2010; Winters et al., 2012). Aunque no se ha demostrado que las CDEP así formadas puedan diferenciarse en endotelio o cardiomiocitos, es probable que este proceso sea beneficioso para contrarrestar los efectos de la isquemia cardiaca, gracias a la producción de factores angiogénicos y

promotores de supervivencia (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010; Zhou et al., 2011; González-Rosa et al., 2012; Wang et al., 2013).

3.1.11. Conclusiones

A lo largo de nuestra revisión hemos mostrado la gran importancia del epitelio celómico embrionario, tanto como origen de células mesenquimáticas para órganos en desarrollo como fuente de señales esenciales para la morfogénesis de dichos órganos. A pesar de los recientes avances en este campo, quedan una serie de puntos que deberían ser dilucidados en un futuro próximo, por ejemplo:

- Es necesario completar el mapa del linaje de las CDEC. No es conocida la contribución en órganos como el bazo o metanefros. En nuestra revisión citábamos también al páncreas, un estudio que abordamos tras la publicación de este artículo.
- ¿Son comunes los mecanismos moleculares que regulan los procesos de TEM del epitelio celómico?
- ¿Qué factores están implicados en la función señalizadora del epitelio celómico?
- ¿Son realmente pluripotenciales las CDEC?
- ¿Cómo se regula la diferenciación de las CDEC?

Estamos convencidos de que las respuestas a estas preguntas tendrán relevancia desde el punto de vista traslacional.

3.2. Publicación 2

Mesothelial-mesenchymal transitions in embryogenesis

Transiciones mesoteliales-mesenquimales en embriogénesis

Rita Carmona, Laura Ariza, Elena Cano, Manuel Jiménez-Navarro, Ramón Muñoz-Chápuli

Seminars in Cell and Developmental Biology, 2018. pii: S1084-9521(17)30538-4
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.09.006>

Nuestra segunda revisión se publicó en una edición especial de *Seminars in Cell and Developmental Biology*, dedicada al mesotelio. Nuestro propósito fue el de presentar una revisión actualizada de los procesos de transición epitelio-mesénquima (TEM) que afectan al mesotelio o epitelio celómico embrionario y que son fundamentales para la morfogénesis de diversos órganos y para el desarrollo general del organismo. Es importante tener en cuenta que epitelio y mesénquima son dos formas celulares básicas y que las transiciones entre estas dos formas son fundamentales para entender no sólo el desarrollo embrionario sino también la evolución de los metazoos. De hecho los eumetazoos junto con los placozoos y las esponjas homoescleromorfas (es decir todos los animales con excepción de las demás esponjas) se reúnen bajo la denominación *Epitheliozoa* precisamente por compartir la innovación evolutiva consistente en la formación de epitelios. A partir de animales básicamente “epiteliales” como los cnidarios, los procesos de TEM o más bien, los ciclos de TEM y su proceso inverso, la transición mesénquima-epitelio (TME) configuraron organismos de una creciente complejidad. Estos procesos son básicamente embrionarios, pero pueden ser recapitulados en la vida adulta, tanto en condiciones fisiológicas como patofisiológicas. Esto confiere un interés traslacional al conocimiento de los mecanismos que los regulan, puesto que la TEM es el proceso usado por las células tumorales para la producción de células metastásicas, e interviene en la fibrosis de diferentes órganos. Por otro lado un proceso de TME parece ser necesario para el desarrollo de las metástasis a distancia del tumor primario (Chaffer et al, 2006).

A continuación se resumen los diferentes aspectos incluidos en nuestra revisión:

En primer lugar comenzamos con una discusión del término “Mesotelio” referido al epitelio celómico, y a la relación entre el mesotelio embrionario y el adulto. Como señalamos en nuestra anterior revisión, el epitelio celómico embrionario muestra características diferentes a las del mesotelio adulto, comenzando por su capacidad para ejecutar una TEM en respuestas a señales de su entorno. También describimos las características, origen embrionario y evolución del mesotelio.

3.2.1. TEM y TME: Bases de su regulación

En este apartado hacemos una revisión general de los mecanismos que regulan la TEM y la TME en diferentes procesos embrionarios tales como la gastrulación, la formación de la cresta neural o las poblaciones mesenquimáticas derivadas de los somitos. Estos mecanismos incluyen señales exógenas, vías de transducción de dichas señales, factores de transcripción y moduladores epigenéticos (revisado en Nieto et al., 2016; Lamouille et al., 2014). Es el balance entre estos reguladores lo que determina el fenotipo epitelial o mesenquimático de la célula y su comportamiento.

Un papel clave en la TEM lo desempeñan los factores represores de E-Cadherina, una molécula de adhesión clave para la estabilidad epitelial. En esta categoría se incluyen abundantes represores transcripcionales, incluyendo miembros de la familia Snail, proteínas de unión a E-Box como Zeb1 y 2, factores bHLH como Twist1 y 2, y factores con dominio Forkhead como Fox1 y 2 (revisado en Nieto et al., 2016; Chen et al., 2017).

Sobre estos factores interviene una capa de reguladores epigenéticos, entre los que destacan los micro RNAs miR200 y miR34, cuyas dianas son Zeb1 y Snail1 respectivamente (revisado en Nieto et al., 2016).

En lo que se refiere a las señales que desencadenan la TEM, citamos a miembros de las familias TGF β y FGF, así como las vías mediadas por Notch, Wnt y Hedgehog (González y Medici, 2014).

La TEM implica activación de GTPasas pequeñas implicadas en la regulación de la dinámica de la actina y la motilidad celular. El papel de RhoA parece ser muy importante en la TEM, al promover la formación de fibras de estrés (Lamouille et al., 2014) aunque debe ser regulado negativamente en la región basal de las células epiteliales para la degradación y rotura de la lámina basal (Nakaya et al., 2008a,b). De

hecho, la pérdida de RhoA induce TEM (Ozdamar et al., 2005) y su sobreexpresión la inhibe (Gros y Tabin, 2014).

La regulación molecular de la TME es menos conocida, pero básicamente consiste en la inhibición de los factores activadores de la TEM. El proceso embrionario mejor conocido de TME es la somitogénesis, que depende de un factor bHLH denominado Paraxis (Takahashi et al., 2005; Dale et al., 2006; Morales et al. 2007; Thiery et al., 2009). Dado que los BMPs son potentes activadores de Snail, los inhibidores de BMP han sido señalados también como promotores de TME (Ohta et al., 2010).

Para la estabilidad del epitelio son importantes los llamados “mantenedores del epitelio” tales como el ya mencionado miR200, que regula negativamente Zeb1, el factor Ovo1/2 y p53. La acetilación específica de histonas H2A y H2B también protege el fenotipo epitelial (Nieto y Cano, 2012).

3.2.2. TEM y TME están implicadas en la formación del mesotelio embrionario

Ya hemos señalado anteriormente la importancia de rondas de TEM y TME en el desarrollo del mesodermo. Tras la gastrulación de amniotas, las células mesodérmicas migran hacia los lados y dan lugar, más allá de los somitos y el mesodermo intermedio, a la placa lateral. La cavidad que se desarrolla en el interior de la placa es el celoma o cavidad general del cuerpo. El mesodermo que reviste al celoma adquiere características epiteliales por un proceso de TME y constituye el mesotelio lateral, somatopleural y esplancnopleural.

No se conocen bien los mecanismos que regulan esta TME, pero es probable que la inhibición de las señales mediadas por BMP desempeñen un papel, del mismo modo que lo hacen en el cese de la gastrulación (Ohta et al., 2010). De hecho, la presencia de BMP exógeno interfiere con este proceso (Schmidt et al., 1998). En embriones de pollo, la señalización por BMP regula la TEM del mesodermo lateral, dando lugar al mesenterio dorsal (Arraf et al., 2016).

Como ya hemos señalado en nuestra anterior revisión y como detallaremos en la siguiente sección, el epitelio celómico espláncnico es una importante fuente de mesénquima durante la organogénesis. En embriones de pollo esta es la fuente principal para el mesénquima del mesenterio dorsal y area subaórtica (Arraf et al., 2016). Por otro lado, otros eventos de TEM ocurren en el somito, originando los

mioblastos de los miembros, y en el campo cardiaco, dando lugar al endocardio (Thiery et al., 2009).

3.2.3. El destino de las células derivadas del mesotelio embrionario

Existen distintos procedimientos para trazar el destino y el linaje de las células que derivan de epitelio celómico por un proceso de TEM. Es posible marcar directamente dicho epitelio con moléculas fluorescentes, o utilizar un marcaje genético usando la tecnología Cre-Lox. La posibilidad de disponer de *drivers* Cre inducibles por tamoxifeno permite afinar el marcaje, realizándolo en una ventana temporal determinada (Wilm y Muñoz-Chápuli, 2016a,b).

Entre los *drivers* Cre útiles para el marcaje genético del mesotelio podemos destacar al $Wt1^{Cre}$ constitutivo o al $Wt1^{CreERT2}$ inducible. Ambos han sido frecuentemente utilizados con este fin. Ello es debido a que WT1 es expresado de forma dinámica en áreas donde el epitelio celómico sufre procesos de TEM (Moore et al., 1998). WT1 es regulado negativamente tan pronto como las células derivadas del mesotelio adquieren el fenotipo mesenquimático, aunque en algunos casos la expresión puede persistir algún tiempo o incluso puede aparecer en células que no derivan del mesotelio, como hemos observado recientemente. También se sabe que WT1 puede regular tanto el proceso de TEM como el proceso opuesto de TME, dependiendo del contexto celular (Essafi et al., 2011). Además de WT1, un *driver* mesotelina-Cre también ha sido usado para el marcaje del linaje mesotelial (Rinkevich et al., 2012).

Estas metodologías han proporcionado un cuadro relativamente completo de la contribución de las células derivadas del mesotelio embrionario al desarrollo de diferentes tejidos y órganos. Se proporciona aquí un resumen de lo tratado en nuestra revisión, en este aspecto.

1. Epicardio

El epicardio es el mesotelio cardiaco. La generación de mesénquima por parte del epicardio embrionario es un proceso esencial en el desarrollo cardiaco, ya que este mesénquima contribuye de forma importante al tejido vascular y conectivo del corazón (Ariza et al., 2016). Aunque algunos trabajos utilizaron los *drivers* $Wt1^{Cre}$ y $Tbx18^{Cre}$ para proponer un linaje epicárdico de parte de los cardiomiocitos (Cai et al., 2008; Zhou et al., 2008), la adecuación del primero de estos sistemas para el trazado del

linaje epicárdico ha sido cuestionado (Rudat y Kispert, 2012; Zhou y Pu, 2012), mientras que otros estudios no han encontrado evidencias de este origen epicárdico (Villa del Campo et al., 2016). Sí que se ha evidenciado que el tejido adiposo cardiaco adulto deriva de células del linaje epicárdico (Liu et al., 2014). Como se ha señalado repetidamente en esta memoria, las células derivadas del epicardio embrionario tienen además un papel señalizador dependiente de la vía del ácido retinoico, probablemente mediado por IGF2, FGFs y eritropoyetina (Lavine et al., 2005; Li et al., 2011; Brade et al., 2011; Kubalak y Sucov, 1999).

2. Pulmones

Factores secretados por el mesotelio pulmonar embrionario, y en particular FGF9, son esenciales para la morfogénesis pulmonar (Colvin et al., 2001; Weaver et al., 2003; White et al., 2006). El uso de un *driver* $Wt1^{Cre}$ permitió en un principio demostrar que células derivadas de dicho mesotelio participaban en la formación del músculo liso vascular, los fibroblastos intersticiales y una pequeña porción del endotelio pulmonar (Que et al., 2008). Otro tipo de *driver* $Wt1^{Cre}$ mostró un potencial de diferenciación más amplio, que incluía al músculo liso bronquial y al cartílago (Cano et al., 2013). Resultados similares han sido obtenidos con otros drivers (Rinkevich et al., 2012; Dixit et al., 2013). Sin embargo, Greif et al. no encontraron contribución a la media de la arteria pulmonar usando un *driver* inducible (Greif et al., 2012).

3. Tracto gastrointestinal

El mesotelio del tracto digestivo también proporciona células mesenquimáticas que se integran en el mesodermo esplancopleural. Un *driver* $Wt1^{Cre}$ combinado con marcaje directo mostró que estas células contribuían al músculo liso vascular del intestino (Wilm et al., 2005). De nuevo nuestro grupo mostró nuevos destinos celulares que incluían el músculo liso visceral, una fracción del endotelio y parte de las células de Cajal, que forman el marcapasos digestivo.

4. Hígado

El primordio hepático se desarrolla en el seno del mesénquima del septo transversal. El mesotelio de dicho septo, y más tarde el mesotelio hepático, exhibe una gran capacidad de generar células mesenquimáticas. Esto fue primero demostrado mediante marcaje directo en embriones de pollo (Pérez-Pomares et al., 2004). Más tarde se demostró que lo mismo ocurría en embriones de ratón, en los que buena parte del endotelio de los sinusoides y de las células estrelladas se diferenciaban a

partir de células derivadas del mesotelio (IJpenberg et al., 2007; Asahina et al., 2011). Como en el caso de otras vísceras, el mesotelio hepático también tiene un papel señalizador mediado por factores como la midquina, la pleiotrofina o el factor de crecimiento de hepatocitos, todo ello bajo control del factor WT1 (Onitsuka et al., 2010). Esta observación explica la hipoplasia hepática observada en ratones deficientes en WT1 (IJpenberg et al., 2007).

5. Páncreas

De la misma forma que en el caso del hígado, el páncreas se forma por interacciones entre brotes endodérmicos y mesénquima esplancopleural. En nuestra revisión avanzábamos ya nuestros primeros resultados, por entonces no publicados todavía, sobre la importante generación de mesénquima por parte del mesotelio pancreático embrionario. Este mesénquima contribuye al músculo liso vascular, a una fracción menor del endotelio y a una buena parte de las células estrelladas pancreáticas. Estos resultados avanzados en nuestra revisión han sido publicados en los otros dos artículos que conforman esta memoria de tesis doctoral por lo que no vamos a desarrollarlos más en este apartado.

6. Bazo

Del mismo modo que hicimos en nuestra otra revisión, señalamos aquí la falta de información acerca de la TEM del mesotelio esplénico y el destino de las células que podrían derivar de dicho proceso.

7. Gónadas y adrenales

La contribución mesotelial al desarrollo gonadal se conoce desde hace mucho tiempo. Ya en 1998 Karl y Capel demostraron el origen mesotelial de las células de Sertoli (Karl y Capel, 1998). Más recientemente se ha comprobado un origen similar para las células de Leydig y las de la granulosa ovárica (Bohnenpol et al., 2013, Hatano et al., 1996), un proceso dependiente del gen *Emx2* (Kusaka et al., 2010). El primordio corticoadrenal, que se desarrolla asociado a las crestas genitales, también recibe una importante población de células derivadas del mesotelio embrionario (Carmona et al., 2016). En ambos casos, la generación de mesénquima depende del factor WT1 (Moore et al., 1999).

8. Sistema genitourinario

Es todavía incierto el grado de contribución de células derivadas del mesotelio al mesénquima meso y metanéfrico. Sí se ha comprobado una contribución al conducto de Müller y al músculo liso del útero (Guioli et al., 2007).

9. Pared corporal y otros tejidos

La morfogénesis del mesenterio dorsal depende de una TEM simétrica del mesodermo de la placa lateral, mediada por señales BMP (Arraf et al., 2016). La expresión de BMP en el mesenterio dorsal del embrión de pollo ha sido relacionada con la tasa diferencial de elongación entre intestino y mesenterio, determinando así el número y la rigidez de bucles intestinales en el adulto (Nerurkar et al., 2017). Más adelante veremos también la relación entre mesenterio dorsal y asimetría derecha/izquierda.

Utilizando el *driver* inducible mesotelina^{CreERT2}, Rinkevich et al. mostraron una abundante contribución de células derivadas del mesotelio al mesénquima del tronco, la pared aórtica y el estroma del timo (Rinkevich et al., 2012).

La generación de mesénquima derivado del mesotelio es crítico para la formación de los compartimentos celómicos, incluyendo los pliegues peritoneales, que formarán el diafragma (Norden et al., 2010; Carmona et al., 2016). Este mesénquima también participa en la formación del tejido adiposo visceral (Chau et al., 2014), incluyendo el cardíaco (Liu et al., 2014). Y como hemos señalado en nuestra anterior revisión, las células derivadas del mesotelio somatopleural están implicadas en el desarrollo de los miembros pares en un proceso dependiente de FGF10 y Tbx5 (Gros y Tabin, 2014).

3.2.4. Mesotelio embrionario y asimetría derecha-izquierda

En los últimos años se ha evidenciado que el mesotelio embrionario desempeña un importante papel en el establecimiento de la asimetría derecha-izquierda. Cambios asimétricos en la arquitectura del mesenterio dorsal inducen la torsión del tubo digestivo y el enrollamiento de las asas intestinales en sentido contrahorario (Kurpios et al., 2008). Esta asimetría mesentérica se asocia a la expresión asimétrica de Pitx2 e Islet1 a la izquierda y Tbx18 a la derecha (Davis et al., 2008). Debajo de Pitx2 actúan la proteína citosquelética Shroom3 y la molécula de adhesión N-cadherina (Plageman et al., 2011).

Inductores de la TEM mesotelial, tales como *Prrx1* y *Snail1*, también se han relacionado con la generación asimétrica de mesénquima desde el mesodermo de la placa lateral, induciendo la asimetría cardíaca (Ocaña et al., 2017). La generación asimétrica de mesénquima se ha relacionado también por nuestro grupo con la hernia diafragmática congénita, mucho más frecuente en el lado izquierdo (Carmona et al., 2016).

3.2.5. TEM en el mesotelio adulto. Implicaciones clínicas

El mesotelio adulto, a diferencia del embrionario, ha sido considerado como un epitelio relativamente pasivo, responsable de reducir la fricción entre las vísceras. Sin embargo, cada vez son más las funciones que se atribuyen al mesotelio adulto, incluyendo el transporte de fluidos, respuesta inmune o reactividad a señales (Mutsaers et al., 2016). Su capacidad regenerativa es muy importante e implica la liberación de células reparadoras a la cavidad celómica (Carmona et al., 2011; Mutsaers et al., 2016; Chen et al., 2014). La capacidad del mesotelio adulto para generar células fibroblastoides en un proceso que mimetiza la TEM embrionaria, está probablemente relacionada con este comportamiento dinámico. Esto se produce, por ejemplo, en condiciones tales como la diálisis peritoneal recurrente (Yáñez-Mo et al., 2003). Una situación similar parece producirse en el corazón tras un infarto (Limana et al., 2011; Di Meglio et al., 2010).

Si las células mesoteliales adultas son capaces de recapitular el proceso embrionario de TEM, cabe preguntarse si las células resultantes son pluripotenciales. Esta es una cuestión que sigue abierta, aunque las evidencias a su favor son bastante escasas (revisado en Ariza et al., 2016).

3.2.6. Conclusiones

Los procesos de TEM del mesotelio embrionario son eventos críticos en el desarrollo. Aunque el conocimiento de su regulación a nivel molecular ha avanzado mucho en los últimos años, quedan todavía muchos interrogantes por resolver. No conocemos todavía cómo se regula el destino de las células derivadas del mesotelio, que muestran variados potenciales de diferenciación en los distintos órganos. No conocemos bien si el mesotelio embrionario es un tejido homogéneo, si las células que derivan de él son pluripotenciales o están comprometidas en un linaje. Seguimos sin

comprender cómo se toma la decisión de transformarse en célula mesenquimática o permanecer en el revestimiento epitelial. En cuanto a la capacidad del mesotelio adulto para recapitular capacidades embrionarias, siguen existiendo muchas incertidumbres. Lo que sí parece claro es que las respuestas a estos interrogantes podrían tener un gran interés desde el punto de vista traslacional.

3.3. Publicación 3

Role of the Wilms' tumor suppressor gene *Wt1* in pancreatic development

*Papel del gen supresor del tumor de Wilms (*Wt1*) en el desarrollo pancreático*

Laura Ariza, Ana Cañete, Anabel Rojas, Ramón Muñoz Chápuli, Rita Carmona

Dev Dyn. 2018 Jul;247(7):924-933. doi: 10.1002/dvdy.24636

Es conocido que el gen supresor de tumores de Wilms (*Wt1*) participa en el desarrollo de diferentes órganos como los riñones y las gónadas (Kreidberg et al., 1993), bazo (Herzer et al., 1999), suprarrenales (Moore et al., 1999), hígado (IJpenberg et al., 2007; Asahina et al., 2011), corazón (Norden et al., 2010; Martínez-Estrada et al., 2010; Cano et al., 2016), pulmones (Cano et al., 2013), y diafragma (Carmona et al., 2016). Sin embargo, el hipotético papel que podría desempeñar el gen *Wt1* en el desarrollo del páncreas no ha sido previamente descrito. La expresión de WT1 está restringida al mesotelio pancreático entre los días embrionarios E10.5 y E15.5, pero no se ha observado expresión en el estroma de este órgano durante el desarrollo.

El páncreas de ratón se forma a partir de un primordio dorsal en el día embrionario E9.5 y de otro primordio ventral en el día E10.5. Ambos primordios son derivados endodérmicos (revisado en Gittes, 2009).

Las células endodérmicas dan lugar a los principales tipos de células pancreáticas, es decir, las células acinares exocrinas, células ductales y células endocrinas de los islotes de Langerhans. Por su parte, las células mesodérmicas del estroma colaboran a la formación del tejido vascular y conectivo y a una población específica de células que son las células estrelladas pancreáticas (CEP) (Kim y Hebrok, 2001; Gittes, 2009). El origen preciso de las CEP en el embrión no se había descrito, a pesar de su importancia en condiciones normales y patológicas.

Las CEP comparten muchas características con las células estrelladas hepáticas del espacio perisinusoidal, estando involucradas en el proceso de fibrosis. Durante el desarrollo embrionario el mesotelio hepático origina células mesenquimáticas que contribuyen a las células estrelladas hepáticas y al endotelio vascular durante el desarrollo (IJpenberg et al., 2007; Asahina et al., 2011).

La importancia de la aparición de células mesenquimales a través del proceso de transición epitelio mesénquima (TEM) del epitelio celómico o el revestimiento mesotelial de órganos ha sido muy estudiado en órganos como el corazón (Ruiz-Villalba y Pérez Pomares, 2012), los pulmones, el hígado y el intestino, y ha sido objeto de nuestra revisión (Ariza et al., 2016). Por ello nos planteamos si un proceso similar podría contribuir a la formación del mesénquima pancreático y, en concreto, de las CEP.

Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de la proteína WT1 en el mesotelio pancreático en desarrollo. Comprobamos que las células mesoteliales daban lugar a células mesenquimales y que una parte de este mesénquima se diferenciaba en CEP, contribuyendo también a otros tipos celulares. La delección condicional de *Wt1* entre E9.5 y E12.5 provocó un retraso en el crecimiento de la yema pancreática ventral, mientras que los mutantes sistémicos mostraron defectos en la localización del páncreas y malrotación intestinal. Describimos estos resultados más detalladamente a continuación.

Resultados

3.3.1. El mesotelio pancreático expresa WT1 y da lugar a células mesenquimales durante el desarrollo

Para el trazado de las células derivadas del mesotelio durante el desarrollo pancreático hemos utilizado los *drivers* *Wt1*^{Cre} y el inducible por tamoxifeno *Wt1*^{CreERT2}. La expresión de WT1 se vio restringida al mesotelio pancreático en todos los estadios embrionarios estudiados, aunque entre E12.5-E13.5 se observó una inmunorreactividad residual de WT1 en algunas células submesoteliales. Esto sugería un descenso en la regulación de la expresión de WT1 durante la TEM del mesotelio (figuras 1A-C del artículo). En la figura 1D-F del artículo se muestran discontinuidades en la lámina basal (puesta de manifiesto por la inmunorreactividad del marcador laminina), así como una escasa o nula expresión de E-cadherina y signos de pérdida de adhesión lateral entre células mesoteliales, que además mostraban procesos citoplasmáticos basales. Otras características de la TEM es el patrón puntiforme de la inmunorreactividad de citoqueratina en las células submesoteliales (figura 1E del artículo). En el estadio E15.5 se observó la recuperación de una lámina basal continua bajo el mesotelio y un aumento de la expresión de E-cadherina entre las células

mesoteliales. Esto sugería el fin de la TEM. La enzima RALDH2 se localizó en el mesotelio pancreático en todas las etapas estudiadas (figuras 1G-H del artículo).

En cuanto al trazado de las células derivadas del mesotelio, en la figura 1I se muestra que sólo unas pocas células aparecen teñidas en el estroma pancreático de embriones E14.5 cuando la inducción del reportero YFP se produjo en E9.5. No obstante, el número de estas células aumentó fuertemente en E15.5 cuando la inducción se realizó entre E9.5 y E11.5 (figura 1J del artículo). Estos resultados nos indican que el origen de las células de linaje WT1 derivadas del mesotelio es posterior a E10.5.

En la figura 2 del artículo vemos imágenes estáticas obtenidas de un vídeo *time lapse* de un explante pancreático. El explante procedía de un embrión $Wt1^{Cre}; R26R^{EYFP}$ en estadio E12.5. El vídeo mostró claramente signos de migración de células YFP^+ en áreas de TEM desde el mesotelio hacia los acinos que estaban en crecimiento. La figura 2B del artículo corresponde a un área del mesotelio con falta de signos de TEM. En la última figura de este apartado del artículo (figura 2D) se muestra cómo las células del linaje WT1 migran y se intercalan entre las ramificaciones de los acinos. Todo esto evidencia que células de origen mesotelial y del linaje WT1 contribuyen a una porción significativa del estroma pancreático.

3.3.2. Una gran parte de las células estrelladas pancreáticas deriva del linaje celular que expresa WT1

Pudimos observar como uno de los marcadores característicos de las CEP, la desmina, se coexpresaba con el marcador de linaje YFP en muchas células del páncreas en desarrollo en los estadios E14.5 y E15.5 (figura 3A,B del artículo respectivamente); la coexpresión de GFAP (otro marcador de las CEP) con YFP confirmó que en los embriones más avanzados una parte sustancial de las CEP poseen un origen mesotelial (E18.5), tal como muestra la figura 3C del artículo.

El marcador de pericitos y otras células perivasculares, NG2, y el marcador endotelial CD31/Pecam-1 también se coexpresaban ocasionalmente con YFP en la pared de los vasos pancreáticos en desarrollo y los capilares en E18.5 (figuras 3D-F del artículo).

Siguiendo con el mismo modelo animal, en la figura 4 del artículo se muestra la falta de diferencias entre el páncreas dorsal y ventral en cuanto a la contribución de células YFP⁺.

En la figura 5 del artículo se muestran los resultados obtenidos tras la realización de la citometría de flujo analítica a varios páncreas disgregados obtenidos de embriones en etapa E14.5. Aproximadamente un tercio de todas las células del páncreas pertenecen al linaje celular que expresa WT1. Por otra parte, un 10% de endotelio pancreático tiene este mismo origen mesotelial.

3.3.3. La eliminación de WT1 en el mesotelio provoca un retraso en el crecimiento del páncreas ventral, un mesogastrio defectuoso, una ubicación anormal del páncreas dorsal y una malrotación intestinal

En este apartado comprobamos cómo la expresión de WT1 afectaba al desarrollo pancreático. Los embriones de nuestro primer modelo animal estudiado, de edades comprendidas entre E13.5 y E14.5 y con delección sistémica de WT1, ($Wt1^{GFP/GFP}$), mostraron un páncreas con un tamaño similar al que tenían los heterocigotos controles de la misma camada ($Wt1^{GFP/+}$), pero también mostraron anomalías en la localización del páncreas dorsal, debido a un desarrollo defectuoso del mesogastrio. La mayor parte de estos embriones mostraron malrotación intestinal, con el duodeno situado a la izquierda y bajo el estómago (figuras 6A-H del artículo).

El segundo modelo animal corresponde a embriones $Wt1^{CreERT2}$, $Wt1^{fllox}$ inducidos con tamoxifeno a edades comprendidas entre E9.5 y E11.5 (tres dosis de tamoxifeno) y fijados en los estadios E15.5 y E16.5 (figuras 6I y 6J del artículo). También se realizó la inducción entre E9.5 y E12.5 (cuatro dosis) con un análisis posterior en E16.6. En el primer caso no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, con cuatro dosis se produjo un retraso en el desarrollo de la yema pancreática ventral y acinos más dispersos que en los individuos controles (figuras 6K,L, 7A y 7B del artículo).

En la figura 7C del artículo estudiamos mediante inmunolocalización de fosfohistona-H3 la proliferación de las células acinares pancreáticas en embriones mutantes sistémicos $Wt1^{GFP/GFP}$. El resultado, considerando el páncreas dorsal y ventral juntos fue una tasa mitótica menor que en la camada control $Wt1^{GFP/+}$.

La delección condicional de WT1 en embriones mutantes y control E16.5 reveló una diferenciación normal del páncreas, como señala la expresión de amilasa,

insulina, glucagón, Ptf1a, mucina, desmina, E-cadherina, PDX1, neurogenina y RALDH2 (algunos ejemplos mostrados en la figura 8 del artículo). Por tanto, la expresión de WT1 es dispensable para la diferenciación de compartimento endodérmico del páncreas.

3.3.4. El mesotelio adulto no contribuye a la renovación de la población de las células estrelladas pancreáticas

Esto se llevó a cabo en un ratón adulto WT1^{CreERT};R26R^{EYFP}, donde se comprobó un mes después de la inducción por tamoxifeno la presencia de células estrelladas YFP+ en el mesotelio pancreático, pero no dentro del páncreas. Los resultados obtenidos indican ausencia de contribución postnatal de células derivadas del mesotelio a este órgano.

3.3.5. Resumen de la discusión

En el presente artículo se corroboran los resultados publicados por Angelo y Tremblay (2018) sobre la TEM del mesotelio pancreático obtenidos por marcaje directo. También queda demostrada la presencia de WT1 en el mesotelio pancreático embrionario y cómo disminuye su expresión tras originar células mesenquimales que participan en el desarrollo del órgano.

Wt1^{Cre} ha resultado ser una herramienta fiable para trazar las células derivadas del mesotelio pancreático. Cuando se produce la activación del reportero en E9.5 las células mesenquimales detectadas son muy pocas. Esto parece indicar que la etapa en la que se genera estroma pancreático por TEM mesotelial es entre E10.5 y E14.5.

Las células derivadas del mesotelio dan lugar a endotelio y células perivasculares del páncreas en desarrollo, participan en la formación de las células estrelladas pancreáticas y de las células estrelladas de los islotes (Zha et al., 2014). Sin embargo, como se muestra en la figura 9 del artículo, después del nacimiento esta contribución no parece significativa.

Los hallazgos obtenidos con la delección de WT1, muestran que éste no es esencial para el desarrollo del páncreas, ya que la yema pancreática dorsal se desarrolla normalmente al menos hasta 16.5. La yema pancreática ventral sí que sufre cierto retraso en cuanto al crecimiento, con una disminución en el número y densidad de los acinos. Esto puede deberse a una menor proliferación de células endodérmicas,

como hemos visto en mutantes sistémicos, lo que nos hace pensar que existe un mecanismo de señalización derivado de las células derivadas del mesotelio y dependiente de WT1.

En mutantes sistémicos el tamaño del páncreas es normal en E13.5 y E14.5 (límite de la supervivencia de los embriones), pero el mesogastrio es defectuoso y la yema pancreática dorsal se encuentra anormalmente localizada en el mesenterio dorsal. Algunos de estos mutantes mostraron una malrotación del intestino, con el duodeno situado en el lado izquierdo. Por tanto, WT1 resulta ser fundamental para un correcto desarrollo del mesogastrio y la adecuada rotación intestinal. Debido a que los mutantes sistémicos de WT1 de más edad morían por defectos en otras vísceras (básicamente corazón) no conocemos si la diferencia existente entre las yemas dorsales y ventrales se extiende a estadios posteriores o si la falta de WT1 podría afectar también a la formación del páncreas endocrino.

Recapitulando, WT1 es un regulador de la morfogénesis de un órgano endodérmico como es el páncreas, aunque según lo observado las consecuencias que tiene la pérdida de WT1 son menores comparadas con lo que se ha descrito en órganos mesodérmicos (corazón, riñón, glándulas suprarrenales, gónadas o bazo). En este artículo también hemos demostrado que una parte sustancial de las células estrelladas pancreáticas se originan de células mesenquimáticas derivadas del mesotelio embrionario, como también ocurre con las correspondientes células del hígado (ver revisión Ariza et al., 2016).

3.4. Publicación 4

The Wilms' tumor suppressor gene regulates pancreas homeostasis and repair

El gen supresor del tumor de Wilms regula la homeostasis y la reparación pancreática

Laura Ariza, Anabel Rojas, Ramón Muñoz-Chápuli, Rita Carmona

PLoS Genetics 15(2): e1007971 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007971>

El páncreas está recubierto por un mesotelio que expresa el factor de transcripción WT1. De hecho, mesotelio y podocitos renales son los principales sitios de expresión de WT1 en adultos (Hastie, 2017). En un trabajo previo (Chau et al., 2011) se había descrito que la delección condicional de la expresión de WT1 en ratones adultos provocaba un fallo multiorgánico letal que incluía una masiva atrofia del páncreas. En nuestro anterior artículo habíamos descrito que una parte significativa de las células estrelladas del páncreas (CEP), fundamentales en procesos de reparación, pertenecen a un linaje que expresa WT1 en embriones. Por estos motivos, nos planteamos investigar qué sucede con el mesotelio pancreático y las CEP cuando el gen *Wt1* se deletiona en el ratón adulto. Los resultados, que describiremos a continuación, nos llevaron a estudiar la expresión de WT1 cuando se induce farmacológicamente una pancreatitis tanto en ratones normales como en ratones con delección previa de dicho gen. Los resultados obtenidos en su conjunto revelaron que el gen *Wt1* desempeña un papel nuevo y esencial para la homeostasis del páncreas adulto y para su regeneración después de un daño.

3.4.1. La expresión de WT1 se restringe al mesotelio pancreático

En este apartado se observó la presencia de la proteína WT1 en células mesoteliales. Esta expresión es variable ya que no todas las células mesoteliales la presentan. En los animales *Wt1^{Cre};R26R^{EYFP}* (figura 1A del artículo) localizamos expresión de proteína WT1 sólo en células mesoteliales, pero no se encontró dicha expresión dentro del páncreas, donde sí se localizan células del linaje WT1. En individuos *WT1^{GFP/+}* no se expresa el reportero WT1 en las CEP, caracterizadas por la expresión de desmina (figura 1C del artículo), pero sí en el mesotelio. Los datos obtenidos por inmunohistoquímica se confirmaron con una RT-PCR, que mostró expresión del gen *Wt1* exclusivamente en el mesotelio de un páncreas normal (figura 1D del artículo).

3.4.2. Una parte de la población adulta de CEP deriva de los progenitores que expresan WT1

En el artículo anterior describimos el origen de las CEP a partir de progenitores que expresan WT1 en el páncreas embrionario (Ariza et al., 2018). Usando el modelo de trazado de linaje $Wt1^{Cre};ROSA^{EYFP}$, los resultados demostraron que, en el adulto, una fracción importante de las CEP que expresan desmina mostró el marcador de linaje YFP tanto en el páncreas exocrino como en el endocrino (figuras 1E y 1F del artículo). Esta coexpresión se produjo también en algunas células perivasculares. Mediante citometría de flujo analítica confirmamos la presencia del marcador de linaje WT1, identificando las CEP por su menor densidad, su alta dispersión lateral y su autofluorescencia al ser excitadas con luz ultravioleta, debido al contenido en retinoides (figura 1G del artículo). De esta forma estimamos en un 15% la proporción de CEP derivadas del linaje WT1 en adultos.

3.4.3. La delección de *Wt1* causa deterioro del páncreas, pérdida de marcadores de CEP y defectos en el mesotelio

En la figura 2 del artículo se muestran las consecuencias morfológicas e histológicas de la delección condicional de *Wt1* en las células en las que el promotor de dicho gen está activo, utilizando ratones de la línea $Wt1^{CreERT2}; Wt1^{flox}$. Estos ratones fueron inyectados con tamoxifeno (0.1 mg/g peso) durante 5 días consecutivos y sacrificados al noveno día después de la primera inyección. Los controles Cre^{ERT2} -negativos fueron inyectados también con tamoxifeno. El resultado de la delección (confirmada por RT-PCR, figura 1D y microscopía confocal, figura 3B) fue un páncreas fuertemente agrandado y lleno de una matriz gelatinosa. Las células acinares mostraron una forma redondeada y una menor adhesión entre ellas (figuras 2C-F del artículo). No hubo un aumento significativo de fibrosis tal como muestran diferentes tinciones llevadas a cabo en las figuras 2G-J del artículo. Los islotes de Langerhans presentaban una apariencia normal (figura 2D del artículo).

La tabla 1 detalla una serie de características fisiológicas del páncreas afectado por la delección de *Wt1*. Destaca el aumento de peso fresco, pero no el del peso seco, que se mantiene sin cambios, el mantenimiento del número de células CD105+, que discutiremos más adelante, y la disminución significativa de la expresión de proteína amilasa. Esta disminución contrasta con la ausencia de cambios significativos en la

expresión de RNA mensajeros característicos de la función pancreática, tales como amilasa, elastasa o PTF1A.

Para confirmar la eficacia de la delección del gen *Wt1* se llevó a cabo un análisis con microscopía confocal, que confirmó la ausencia de WT1 en el mesotelio (figuras 3A,B del artículo). La enzima RALDH2 interviene en la síntesis de ácido retinoico y se expresa en el mesotelio pancreático adulto. No encontramos una disminución de su expresión tras la delección de *Wt1* (figura 3C,D). Este resultado fue inesperado, ya que RALDH2 es diana transcripcional de WT1 (Guadix et al., 2011). Sin embargo, sí registramos una disminución de E-cadherina tanto en los acinos como en el mesotelio (figuras 3C,F del artículo). Esta disminución se confirmó por qPCR (figura 3G del artículo). La expresión de laminina se mantuvo, y enfatizó la forma redondeada de los acinos en el mutante comparada con el perfil poligonal de los acinos en el control (figuras 3E y 3F del artículo). Esto, junto con la disminución de E-cadherina, explica la menor adhesión observada entre las células exocrinas.

La α -actina de células musculares lisas es un marcador de la activación de las CEP tras un daño pancreático. En nuestro caso y a pesar del severo daño mostrado por el páncreas tras la delección de *Wt1*, no detectamos aumento de la expresión de este marcador (figuras 3H,I del artículo). Por tanto, no hay activación de CEP tras la delección de *Wt1*.

El marcaje de las CEP con los marcadores canónicos desmina y GFAP fue muy escaso en el ratón mutante (figuras 3J,K y S1 del artículo). Sin embargo, en la Tabla 1 y en la figura S1 del artículo se muestra que las células endoglina (CD105) positivas aparecían con una frecuencia similar al de las células positivas para desmina en ratones control. Esto indica que las CEP permanecen en el tejido, pero pierden sus marcadores canónicos. En la figura S1 también se puede comprobar cómo la expresión de Snail1, característica de un subconjunto de CEP (Loubat-Casanovas et al., 2016), cae después de la delección de *Wt1*. Estos resultados indican que, en los ratones mutantes, la población de CEP no disminuye, sino que pierde los marcadores canónicos y no desarrolla los marcadores de activación. De hecho, no habíamos detectado evidencias de apoptosis en las CEP ni en animales control ni en mutantes (figura S1 del artículo). La delección de *Wt1* provoca en definitiva que las CEP se mantengan en un estado indiferenciado e inactivo.

En cuanto a las células acinares, también describimos cambios funcionales además de los morfológicos. En las figuras 3L y 3M del artículo se muestra la reducción en la inmunorreactividad de la amilasa en el ratón mutante (cuantificada en la Tabla 1) y la anormal localización de la mucina-1, lo que sugiere una alteración en la polaridad de las células acinares (figuras 3N,O del artículo).

Los ratones deficientes en WT1 presentaron una acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal. No encontramos diferencias en la concentración de proteínas en este líquido entre animales mutantes y controles. Se trata por tanto de un transudado del líquido ascítico y no de un exudado inflamatorio. Tras los resultados obtenidos se descartó que la causa de la ascitis estuviera relacionada con una hipertensión portal, ya que no se encontró insuficiencia hepática ni el bazo aparecía hipertrofiado (figura S3 del artículo).

En el líquido ascítico de los mutantes los niveles de α -amilasa fueron elevados, lo cual se corresponde con una acumulación de enzimas pancreáticas en la cavidad peritoneal. Tras la delección de *Wt1*, el mesotelio pancreático de estos ratones aparecía desorganizado y con áreas carentes de uniones intercelulares, como pudimos comprobar con la inmunolocalización de marcadores específicos de estas uniones y con imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica del mesotelio pancreático (figura 4 del artículo).

3.4.4. La pancreatitis inducida por ceruleína provoca una regulación positiva de WT1 en el mesotelio y la expresión *de novo* en CEP activadas

La inyección de ceruleína, una sustancia que estimula la secreción pancreática, provocó una pancreatitis aguda en ratones de linaje *Wt1^{Cre}*; R26RE^{YFP}. El resultado, a las 48 h de la inducción de pancreatitis, fue una gran activación de las CEP con elevada expresión en los niveles de α -actina SMC, RALDH2, desmina (figuras 5A-H, 5K,L del artículo) y marcadores de proliferación (figuras 5I,J del artículo). La activación de las CEP coincidió con un aumento en la expresión de WT1 en el mesotelio y con la aparición de células WT1+ en el espacio entre el mesotelio y el tejido pancreático (figuras 5F y 5H del artículo). En las inserciones de las figuras 5H y 5L del artículo observamos co-expresión de WT1 y desmina o RALDH2, lo que nos sugiere que las CEP expresan WT1 durante su activación. Como ya se ha explicado anteriormente, las CEP en condiciones normales no expresan WT1, de manera que los resultados demuestran que la activación de las CEP tras un daño pancreático implica la expresión

de WT1. Esta expresión se produce tanto en CEP del linaje WT1 (que expresan el marcador de linaje YFP) como en CEP YFP-negativas, en las que, por tanto, la expresión se produce *de novo* (figura 5H, inserto).

Tres semanas después del tratamiento con ceruleína en los mismos ratones y tal como era de esperar, el páncreas se presenta totalmente recuperado de la pancreatitis, con unos niveles normales de expresión de los marcadores WT1, RALDH2 y CEP. En las figuras 5M y 5N del artículo se observa como la expresión de WT1 se restringe de nuevo al mesotelio. Las CEP desmina+ son numerosas tras la recuperación del daño y frecuentemente muestran el marcador de linaje de WT1, (figuras 5S y 5T del artículo). Esto indica que después de la pancreatitis la mayoría de CEP quiescentes derivan de células del linaje original WT1 o que expresaron WT1 *de novo* en algún momento del proceso.

3.4.5. La pancreatitis inducida por ceruleína rescata parcialmente a la población de CEP y la organización acinar en ratones con delección condicional de *Wt1*

Quisimos confirmar el efecto que tendría el tratamiento con ceruleína en ratones con delección condicional de *Wt1*. Como se ha descrito, estos ratones, en condiciones normales desarrollan una desorganización severa del páncreas y no sobreviven más allá de los nueve días. Para ello, inyectamos tamoxifeno durante dos días a ratones control *Wt1*^{CreERT2-/-}; *Wt1*^{flox/+} y mutantes *Wt1*^{CreERT2+/-}; *Wt1*^{flox/+}. Después de 48 h, los ratones se trataron con ceruleína o PBS. Es importante destacar que comprobamos que bastaban dos dosis de tamoxifeno para producir una delección eficaz de *Wt1* en la mayor parte de las células mesoteliales del páncreas.

En la figura 6A del artículo se muestra cómo en los ratones control en los que se indujo la pancreatitis se activa la expresión de WT1 en las células mesoteliales y estromales. Como era de esperar, no se observó dicha expresión en ratones con delección de *Wt1* inyectados con PBS y por tanto sin desarrollo de pancreatitis (figura 6B del artículo). La observación más relevante fue que en células del estroma pancreático de ratones con delección de *Wt1*, este factor se expresó tras de la inducción de la pancreatitis (figura 6C del artículo). El marcador de activación de las CEP, α -actina de células musculares lisas, y la enzima RALDH2, fueron expresados tras la inducción de pancreatitis tanto en animales controles como en mutantes con delección de *Wt1* (figuras 6D-6F del artículo). Por consiguiente, este experimento

demostró que las CEP son capaces de activarse y expresar WT1, aunque se haya provocado previamente una delección de este factor en las células WT1-positivas, fundamentalmente en el mesotelio pancreático.

Después de 10-12 días de haber finalizado el tratamiento con ceruleína, los ratones se habían recuperado de la pancreatitis. En los ratones mutantes que habían sufrido la pancreatitis se observaron células WT1-positivas entre el mesotelio y el tejido pancreático, y también alrededor de los acinos (figuras 6G-I del artículo). El número de células desmina-positivas aumentó en el páncreas mutante tras la pancreatitis (figura 6L del artículo).

RALDH2 y el marcador de proliferación celular PCNA mostraron también una mayor expresión en aquellos ratones con delección de *Wt1* tratados con ceruleína (figuras 6M-O del artículo). El aumento de RALDH2 en el ratón mutante después de la recuperación de la pancreatitis fue cuantificado por análisis de imagen como se muestra en la figura S5 del artículo.

Por tanto, estos resultados sugieren que una parte de la población de CEP quiescentes es rescatada por la pancreatitis a pesar de la delección de *Wt1*.

3.4.6. Resumen de la discusión

Debido a que la expresión del gen *Wt1* se restringe a determinados tejidos (mesotelio, podocitos) en el individuo adulto y lo hace a niveles reducidos, fue una sorpresa el fenotipo tan severo causado por la supresión de este gen en ratones. Pensamos que nuestros resultados revelan nuevas y significativas funciones de este gen *Wt1* en organismos adultos que pueden explicar parte de este severo fenotipo.

El mesotelio pancreático difiere al de resto de órganos en cuanto a morfología, además de no aparecer estrechamente unido al tejido subyacente como ocurre en otros mesotelios adultos. Una parte de las células del estroma pancreático deriva de células mesoteliales durante el desarrollo (como demuestra el marcador de linaje de WT1). En estas células se incluyen muchas CEP originadas probablemente durante el desarrollo embrionario, ya que en condiciones normales no se produce una generación postnatal sustancial de CEP a partir del mesotelio (Ariza et al., 2018).

La consecuencia más llamativa de la delección de *Wt1* en las células mesoteliales consiste en la filtración en la cavidad peritoneal de secreción pancreática, lo que se

explica por la disminución en la expresión de E-cadherina en mesotelio y acinos y el cambio en la polaridad de las células exocrinas (sugerido por la localización anormal de la mucina-1). Como resultado de estos defectos el páncreas aumenta de tamaño y presenta una abundante matriz hialina, seguramente debido a una degradación de la matriz extracelular. Su peso fresco se triplica, aunque su peso seco no varía. Además en estos ratones se produce una fuerte desorganización mesotelial que debe estar relacionada con la ascitis. Sorprendentemente, a pesar de este importante daño, las CEP no se activan en este proceso, pero sí pierden algunos de sus marcadores canónicos de diferenciación, como desmina y GFAP. Las únicas células encontradas en el páncreas que expresan el marcador de fibroblastos FSP1 son al mismo tiempo CD45+. Esta combinación de marcadores aparecen en células denominadas “fibrocitos” que están implicadas en procesos inflamatorios crónicos (Reilkoff et al., 2011).

En relación con esto, el fenotipo que se origina por la ausencia de WT1 no conlleva una fibrosis importante. Esto es consistente con la ausencia de marcadores de activación en las CEP. No obstante, creemos que tras la delección de *Wt1* las CEP se desdiferencian en células fibroblastoides, no fibrogénicas e inactivas, las cuales pueden todavía reconocerse por la expresión del receptor de TGF β endoglina (CD105).

Existen varias posibilidades para explicar estos resultados. Una opción es que existan señales dependientes de WT1 necesarias para la estabilidad estructural del páncreas y que sea el mesotelio de dicho órgano el encargado de secretarlas. Una posibilidad sería la señalización mediada por ácido retinoico, dada la estrecha relación existente entre WT1 y esta ruta (Guadix et al., 2011) y además porque las CEP son almacenadoras de retinoides en condiciones normales (Brun et al., 2016). En contra de este razonamiento cabe mencionar que no detectamos una disminución en la expresión de RALDH2 en el mesotelio del individuo mutante. La otra explicación se basa en el hecho de que el mesotelio constituye una barrera física que evita la difusión de señales morfogenéticas durante el desarrollo (Guo et al., 2014). Es concebible que también ocurra lo mismo en el páncreas adulto. De esta forma concluiríamos que la integridad mesotelial dependiente de WT1 en el páncreas es necesaria para la homeostasis del páncreas exocrino, ya que es un tejido que funcionaría como una fuente de señales moleculares y/o como una barrera física esencial.

Riopel et al. (2013) describieron una disfunción del páncreas exocrino y alteraciones en los contactos acinares célula-célula debido a la pérdida de la expresión de la integrina $\beta 1$. Por otra parte, Loubat-Casanovas et al. (2016) describieron que la delección del factor Snail1 en el mesénquima pancreático provoca la disminución de una subpoblación de CEP junto con la reducción de las estructuras acinares y su reemplazamiento por tejido adiposo. Este último fenotipo, aunque con algunas diferencias, podría tener relación con lo observado por nosotros después de la eliminación de WT1.

Con nuestro modelo de linaje WT1 empleado hemos demostrado que WT1 se expresa en CEP derivadas de mesotelio durante el desarrollo y además *de novo* en otras CEP como respuesta a un daño. También ha quedado demostrado que todo este mecanismo está relacionado con un aumento en la expresión de RALDH2, diana transcripcional de WT1. Es importante señalar que la señalización por RA es imprescindible para la estabilización e inactivación de las CEP (McCarroll et al., 2006; Xiao et al., 2015; Chronopoulos et al., 2016). Así pues, tras un daño pancreático, WT1 podría estar modulando la reestabilización de una parte de la población de CEP y la regeneración de la arquitectura del páncreas mediante la activación del eje RALDH2/RA, ya que otros trabajos anteriores han demostrado que las CEP inactivas son necesarias para mantener la estabilidad del páncreas exocrino (Riopel et al., 2013) y para su regeneración (Zimmermann et al., 2002).

Si se inyecta tamoxifeno durante 5 días en el modelo de delección condicional se provoca una pérdida de expresión del gen en el mesotelio, pero además se está bloqueando la expresión de WT1 en las CEP que deberían activarse para reparar el daño. También se bloquea el eje de señalización WT1/RALDH2/RA, con lo que la población de CEP no se recupera. Como consecuencia el páncreas no consigue recuperarse del daño, que termina provocando la muerte del animal.

Para comprobar lo descrito en el párrafo anterior indujimos una pancreatitis, razonando que podríamos provocar la expresión de WT1 tras haber cesado el tratamiento con tamoxifeno. Nuestros resultados mostraron que las CEP se activaron en ratones con delección previa de *Wt1* y sometidos al tratamiento con ceruleína. Además hubo un aumento en la expresión de WT1/RALDH2 en células estromales y submesoteliales y un mayor reclutamiento de fibrocitos FSP1+/CD45+. Estos animales permanecieron con vida al menos 12 días después del tratamiento con ceruleína,

donde se observaba una recuperación de la expresión de marcadores canónicos en las CEP quiescentes.

Podemos concluir este resumen diciendo que la pancreatitis en ratones con delección de *Wt1* implicó un rescate parcial de la organización de los acinos y la recuperación de una población de las CEP inactiva, precisamente por haber provocado la expresión de WT1 en las CEP. Esto revela una función novedosa y esencial del factor de transcripción WT1 para la homeostasis y reparación del páncreas adulto.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4. PERSPECTIVA GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRESENTE TESIS

Esta tesis doctoral está compuesta por cuatro publicaciones que recogen el trabajo realizado por su autora. Dichas publicaciones se centran en tres aspectos fundamentales:

- 1) El papel desempeñado por las células del epitelio celómico embrionario y por su derivado adulto, el mesotelio. Este papel ha sido minusvalorado durante mucho tiempo, pero cada vez hay más evidencias de que tanto el epitelio celómico embrionario como el mesotelio adulto interactúan de forma muy activa con los órganos que recubren. Nuestras dos publicaciones: *Coelomic epithelium-derived cells in visceral morphogenesis* y *Mesothelial-mesenchymal transitions in embryogenesis*, estaban dirigidas a reunir estas evidencias y proporcionar a sus lectores una información actualizada sobre estos temas.
- 2) Como ejemplo concreto de lo afirmado en el apartado anterior, en nuestro artículo de investigación titulado *Role of the Wilms' tumor suppressor gene Wt1 in pancreatic development*, hemos mostrado cómo el epitelio celómico embrionario, que expresa el factor de transcripción WT1, contribuye al desarrollo pancreático, en concreto a una fracción sustancial de las células estrelladas del páncreas. La expresión de WT1 restringida al epitelio celómico nos permitió usar un *driver* WT1^{Cre} para trazar el destino de las células derivadas del mismo. Por otro lado la delección de *Wt1* reveló un papel insospechado en la rotación intestinal.
- 3) En el páncreas adulto, WT1 se expresa en condiciones normales solamente en el mesotelio. En nuestro segundo artículo de investigación titulado *The Wilms' tumor suppressor gene regulates pancreas homeostasis and repair*, hemos mostrado cómo esta expresión es esencial para el mantenimiento de la integridad del páncreas. De hecho la delección condicional adulta de *Wt1* implica una rápida degeneración del páncreas. En el curso de nuestra investigación advertimos que WT1 se expresaba en las células estrelladas del páncreas activadas tras un daño, y que esta expresión formaba parte esencial de los mecanismos de reparación. Esto explicaba la degeneración pancreática observada tras la delección condicional de *Wt1*, ya que no sólo se afectaba el

mesotelio pancreático, sino que se bloqueaban los mecanismos intrínsecos de reparación de esta víscera.

Por tanto, el nexo entre estas cuatro publicaciones y el núcleo de nuestra tesis doctoral es el triángulo de interacciones establecido entre el mesotelio/epitelio celómico, el factor de transcripción WT1 y el páncreas, tanto adulto como embrionario. En efecto, el epitelio celómico embrionario es uno de los sitios principales de expresión de WT1 durante el desarrollo, y esta expresión está relacionada con la capacidad de dicho epitelio de generar células mesenquimáticas. Las células derivadas del epitelio celómico por este proceso participan activamente en la organogénesis, dando lugar a tipos celulares comunes (endotelio, células perivasculares, fibroblastos) y a células específicas de cada órgano (células de Sertoli, células de la granulosa ovárica, células estrelladas hepáticas y pancreáticas, células intersticiales de Cajal, etc.). Desde el punto de vista evolutivo, podemos concebir este proceso como un mecanismo mediante el cual el epitelio celómico se comporta como una “reserva” de células mesodérmicas pluripotenciales que son suministradas a los órganos en desarrollo de rápido crecimiento.

En el caso concreto del páncreas embrionario, hemos incorporado a este órgano a la lista de las vísceras que 1) reciben una contribución de células derivadas del epitelio celómico y 2) contienen un número importante de células del linaje WT1 que forman parte del estroma pancreático. A diferencia de otros órganos como el corazón, la expresión de WT1 parece relativamente poco importante para el desarrollo pancreático, probablemente porque la menor contribución de células del epitelio celómico se ve compensada por las células del mesodermo esplancnopleural en cuyo seno se desarrolla el endodermo pancreático.

Por último, en el caso del páncreas adulto, creemos haber resuelto la incógnita de la rápida degeneración de este órgano tras la delección condicional de *Wt1*. Por un lado, esta delección causa una desorganización del mesotelio pancreático y por otro lado, este es el proceso esencial, la delección de *Wt1* bloquea el mecanismo de reparación pancreática mediado por las células estrelladas del páncreas y dependiente de WT1. Todo esto ha revelado un nuevo mecanismo de reparación pancreática y una nueva función del factor WT1 en organismos adultos.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

- 1) El factor de transcripción WT1 se expresa en el epitelio celómico del páncreas embrionario. Dicho epitelio celómico origina un mesénquima que contribuye a una porción sustancial de las células estrelladas del páncreas y a otros tipos celulares.
- 2) La falta sistémica de función de WT1 en el embrión provoca una localización anormal de la yema pancreática dorsal dentro del mesenterio, así como malrotación intestinal. La delección condicional de *Wt1* entre los estadios E9.5 y E12.5 solamente provoca una reducción del número de acinos en la yema pancreática ventral.
- 3) La delección adulta de WT1 provoca una degeneración del páncreas exocrino, con disrupción mesotelial, desorganización de la estructura acinar y acumulación de un trasudado ascítico. Las células estrelladas no son activadas por este daño y pierden sus marcadores canónicos.
- 4) La inducción farmacológica de pancreatitis en el ratón adulto provoca la expresión de WT1 en las células estrelladas del páncreas, concomitante con su activación. Si esta pancreatitis se induce tras la delección condicional de WT1, las células estrelladas expresan WT1 y se activan, rescatando en parte el fenotipo causado por la delección, en lo que se refiere a la estructura acinar y a la recuperación de la población de células estrelladas quiescentes.
- 5) WT1, por tanto desempeña importantes papeles en el desarrollo del páncreas y especialmente en su mantenimiento y en los mecanismos de reparación en adultos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW, Albarello L, Calcagno R, Luzi L, Bonifacio E, Doglioni C, Piemonti L.** Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* 2009;52:486-93.
- Angelo JR, Tremblay KD.** Identification and fate mapping of the pancreatic mesenchyme. *Dev. Biol.* 2018. 435:15–25.
- Ambu R, Vinci L, Gerosa C, Fanni D, Obinu E, Faa A, Fanos V.** WT1 expression in the human fetus during development. *Eur. J. Histochem.* 2015;59(2):2499.
- Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H.** Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol.* 1997; 7:801-4.
- Apte MV, Pirola RC, Wilson JS.** Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front. Physiol.* 2012;3:344. doi: 10.3389/fphys.2012.00344.
- Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS.** Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998;43:128-33.
- Ariyaratana S, Loeb DM.** The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2007;9(14):1-17.
- Ariza L, Carmona R, Cañete A, Cano E, Muñoz-Chápuli R.** Coelomic epithelium-derived cells in visceral morphogenesis. *Dev. Dyn.* 2016. 245:307–322.
- Ariza L, Cañete A, Rojas A, Muñoz-Chápuli R, Carmona R.** Role of the Wilms' tumor suppressor gene Wt1 in pancreatic development. *Dev. Dyn.* 2018; 247:924–933.
- Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB.** The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* 1993;40:85-97.
- Arraf AA, Yelin R, Reshef I, Kispert A, Schultheiss TM.** Establishment of the Visceral Embryonic Midline Is a Dynamic Process that Requires Bilaterally Symmetric BMP Signaling. *Dev. Cell* 2016;37:571-80.
- Artamonov MV, Jin L, Franke AS, Momotani K, Ho R, Dong XR, Majesky MW, Somlyo AV.** Signaling pathways that control rho kinase activity maintain the embryonic epicardial progenitor state. *J. Biol. Chem.* 2015;290:10353–10367.
- Asahina K, Zhou B, Pu WT, Tsukamoto H.** Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology* 2011;53:983–995.

- Bahrami A, Joodi M, Maftooh M, Ferns GA, M Ahmadi M, Hassanian SM, Avan A.** The genetic factors contributing to the development of Wilm's tumor and their clinical utility in its diagnosis and prognosis. *J. Cell Physiol.* 2018;233:2882-2888.
- Ballian N, Brunicardi FC.** Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J. Surg.* 2007;31:705-14.
- Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EM, Piantedosi R, Libien J.** Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1791:467-73. doi: 10.1016/j.bbailip.2008.11.001.
- Bohnenpoll T, Bettenhausen E, Weiss AC, Foik AB, Trowe MO, Blank P, Airik R, Kispert A.** Tbx18 expression demarcates multipotent precursor populations in the developing urogenital system but is exclusively required within the ureteric mesenchymal lineage to suppress a renal stromal fate. *Dev. Biol.* 2013;380:25–36.
- Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA.** EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2017;18:128-134. doi: 10.1038/nrc.2017.118.
- Brade T, Kumar S, Cunningham TJ, Chatzi C, Zhao X, Cavallero S, Li P, Sucov HM, Ruiz-Lozano P, Duester G.** Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial Igf2. *Development* 2011;138:139–48.
- Bragg AD, Moses HL, Serra R.** Signaling to the epithelium is not sufficient to mediate all of the effects of transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 4 on murine embryonic lung development. *Mech. Dev.* 2001;109:13–26.
- Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN.** Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays* 2007; 29:166–177.
- Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L.** The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia.* 1994;8(12):2138-43.
- Brodbeck S, Englert C.** Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. *Pediatr. Nephrol.* 2004;19(3):249-55.
- Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R.** Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J. Gastroenterol.* 2017;23:382-405. doi:

10.3748/wjg.v23.i3.382.

- Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J, Evans SM.** A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008;454:104-8.
- Cano E, Carmona R, Muñoz-Chápuli R.** Wt1-expressing progenitors contribute to multiple tissues in the developing lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013;305:322–332.
- Cano E, Carmona R, Ruiz-Villalba A, Rojas A, Chau YY, Wagner KD, Wagner N, Hastie ND, Muñoz-Chápuli R, Pérez-Pomares JM.** Extracardiac septum transversum/proepicardial endothelial cells pattern embryonic coronary arterio-venous connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016;113:656–661.
- Carmona R, Cano E, Grueso E, Ruiz-Villalba A, Bera TK, Gaztambide J, Segovia JC, Muñoz-Chápuli R.** Peritoneal repairing cells: a type of bone marrow derived progenitor cells involved in mesothelial regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* 2011;15:1200-9.
- Carmona R, Cañete A, Cano E, Ariza L, Rojas A, Muñoz-Chápuli R.** Conditional deletion of WT1 in the septum transversum mesenchyme causes congenital diaphragmatic hernia in mice. *Elife*. 2016. 5 pii: e16009
- Carmona R, Cano E, Mattiotti A, Gaztambide J, Muñoz-Chápuli R.** Cells derived from the coelomic epithelium contribute to multiple gastrointestinal tissues in mouse embryos. *PloS One* 2013;8:e55890.
- Carmona R, Guadix JA, Cano E, Ruiz-Villalba A, Portillo-Sánchez V, Pérez-Pomares JM, Muñoz-Chápuli R.** The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development. *J. Cell. Mol. Med.* 2010;14:2066–2072.
- Casanova JC, Travisano S, de la Pompa JL.** Epithelial-to-mesenchymal transition in epicardium is independent of Snail1. *Genesis* 2013;51:32–40.
- Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED.** Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 2006;66:11271-8.
- Charlton J, Irtan S, Bergeron C, Pritchard-Jones K.** Bilateral Wilms tumour: a review of clinical and molecular features. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2017;19:e8. doi: 10.1017/erm.2017.8.

- Chau YY, Bandiera R, Serrels A, Martínez-Estrada OM, Qing W, Lee M, Slight J, Thornburn A, Berry R, McHaffie S, Stimson RH, Walker BR, Muñoz-Chapuli R, Schedl A, Hastie ND.** Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat. Cell Biol.* 2014;16:367-75.
- Chau, YY and Hastie ND.** The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet.* 2012;28:515–524.
- Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, Lee WC, Buza-Vidas N, Nerlov C, Jacobsen SE, Perry P, Berry R, Thornburn A, Sexton D, Morton N, Hohenstein, P, Freyer, E, Samuel, K, van't Hof R and Hastie ND.** Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1. *PLoS Genet.* 2011; 7:e1002404.
- Chen M, Wang X, Wang Y, Zhang L, Xu B, Lu L, Cui X, Li W, Gao F.** Wt1 is involved in Leydig cell steroid hormone biosynthesis by regulating paracrine factor expression in mice. *Biol. Reprod.* 2014;90(4):71. doi: 10.1095/biolreprod.113.114702.
- Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ.** Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J. Cell Physiol.* 2017;232:3261-72.
- Chen YT, Chang YT, Pan SY, Chou YH, Chang FC, Yeh PY, Liu YH, Chiang WC, Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, Duffield JS, Lin SL.** Lineage tracing reveals distinctive fates for mesothelial cells and submesothelial fibroblasts during peritoneal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014;25:2847-58.
- Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM.** Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* 2001;128:2095–106.
- Compton LA, Potash DA, Mundell NA, Barnett JV.** Transforming growth factor-beta induces loss of epithelial character and smooth muscle cell differentiation in epicardial cells. *Dev. Dyn.* 2006;235:82–93.
- Dale JK, Malapert P, Chal J, Vilhais-Neto G, Maroto M, Johnson T, Jayasinghe S, Trainor P, Herrmann B, Pourquié O.** Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis. *Dev. Cell* 2006;10:355-66.

- Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N.** Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 2004;13(2):235-46.
- Davis NM, Kurpios NA, Sun X, Gros J, Martin JF, Tabin CJ.** The chirality of gut rotation derives from left-right asymmetric changes in the architecture of the dorsal mesentery. *Dev. Cell* 2008;15:134-45.
- Del Monte G, Casanova JC, Guadix JA, MacGrogan D, Burch JB, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL.** Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ. Res.* 2011;108:824–836.
- Delgado I, Carrasco M, Cano E, Carmona R, García-Carbonero R, Marín-Gómez LM, Soria B, Martín F, Cano DA, Muñoz-Chápuli R, Rojas A.** GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2014;59:2358–2370.
- Demcollari TI, Cujba AM, Sancho R.** Phenotypic plasticity in the pancreas: new triggers, new players. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017;49:38-46.
- Dettman RW, Pae SH, Morabito C, Bristow J.** Inhibition of alpha4-integrin stimulates epicardial-mesenchymal transformation and alters migration and cell fate of epicardially derived mesenchyme. *Dev. Biol.* 2003;257:315–328.
- Dettman RW, Pae SH, Morabito C, Bristow J.** Inhibition of alpha4-integrin stimulates epicardial-mesenchymal transformation and alters migration and cell fate of epicardially derived mesenchyme. *Dev. Biol.* 2003;257:315–328.
- Di Meglio F, Castaldo C, Nurzynska D, Romano V, Miraglia R, Bancone C, Langella G, Vosa C, Montagnani S.** Epithelial-mesenchymal transition of epicardial mesothelium is a source of cardiac CD117-positive stem cells in adult human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;49:719-727.
- Dickman ED, Thaller C, Smith SM.** Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development* 1997;124:3111–3121.
- Dixit R, Ai X, Fine A.** Derivation of lung mesenchymal lineages from the fetal mesothelium requires hedgehog signaling for mesothelial cell entry. *Development* 2013;140:4398–4406.

- Dokic D, Dettman RW.** VCAM-1 inhibits TGFbeta stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells. *Dev. Biol.* 2006;299:489–504.
- Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A.** Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 2015;7(1):e1024405. doi: 10.1080/19382014.
- Donna A, Betta PG.** Differentiation towards cartilage and bone in a primary tumour of pleura. Further evidence in support of the concept of mesodermoma. *Histopathology* 1986;10:101–108.
- Draganov P, Forsmark CE.** “Idiopathic” pancreatitis. *Gastroenterology* 2005;128:756-763.
- Eid H, Larson DM, Springhorn JP, Attawia MA, Nayak RC, Smith TW, Kelly RA.** Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ. Res.* 1992;71:40–50.
- Essafi A, Webb A, Berry RL, Slight J, Burn SF, Spraggon L, Velecela V, Martinez-Estrada OM, Wiltshire JH, Roberts SG, Brownstein D, Davies JA, Hastie ND, Hohenstein P.** A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev. Cell* 2011;21:559-574.
- Fadare O, Bifulco C, Carter D, Parkash V.** Cartilaginous differentiation in peritoneal tissues: a report of two cases and a review of the literature. *Mod. Pathol.* 2002;15:777–780.
- Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR, Kocher HM.** Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-β-catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 2011;141:1486-97. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.047.
- Gao F, Zhang J, Wang X, Yang J, Chen D, Huff V, Liu YX.** Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(2):333-41. doi: 10.1093/hmg/ddt423.
- Gerald WL.** The molecular genetics of Wilms tumor: a paradigm of heterogeneity in tumor development. *Cancer Invest.* 1994;12(3):350-9.
- Gittenberger-de Groot AC, Winter EM, Poelmann RE.** Epicardium-derived cells in development, cardiac disease and repair of ischemis. *J. Cell. Mol. Med.*

2010;14:1056–1060.

Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev. Biol.* 2009. 326:4–35.

Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 2014;7(344):re8.

González-Rosa JM, Peralta M, Mercader N. Pan-epicardial lineage tracing reveals that epicardium derived cells give rise to myofibroblasts and perivascular cells during zebrafish heart regeneration. *Dev. Biol.* 2012;370:173–186.

Greer JB, Whitcomb DC. Inflammation and pancreatic cancer: an evidence-based review. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009;9:411-8. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.011..

Greif DM, Kumar M, Lighthouse JK, Hum J, An A, Ding L, Red-Horse K, Espinoza FH, Olson L, Offermanns S, Krasnow MA. Radial construction of an arterial wall. *Dev. Cell* 2012;23:482–493.

Gros J, Tabin CJ. Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science* 2014;343:1253-1256.

Gruenwald P. Common traits in development and structure of the organs originating from the coelomic wall. *J. Morphol.* 1942;70:353–387.

Guadix JA, Ruiz-Villalba A, Lettice L, Velecela V, Muñoz-Chápuli R, Hastie ND, Pérez-Pomares JM, Martínez-Estrada OM. Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development* 2011;138:1093–1097.

Guioli S, Sekido R, Lovell-Badge R. The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. *Dev. Biol.* 2007;302:389-98.

Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2002;11(6):651-9.

Hastie ND. Life, sex, and WT1 isoforms--three amino acids can make all the difference. *Cell* 2001 24;106(4):391-4.

Hastie ND. Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development* 2017;144(16):2862-2872.

- Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K.** Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* 1996;1:663-71.
- Heidt DG, Mulholland MW, Simeone DM.** 2009. Pancreas: Anatomy and structural anomalies. Chapter 44. In: *Atlas of Gastroenterology*, 4th edn., eds T. Yamaba et al. Wiley Blackwell Publishing Ltd., Hoboken, NJ, pp. 508-513.
- Hebrok M, Kim SK, Melton DA.** Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* 1998;12:1705-13.
- Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA.** Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 2000;127:4905-13.
- Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C.** The Wilms tumor suppressor gene Wt1 is required for development of the spleen. *Curr. Biol.* 1999;9(15):837-40.
- Hohenstein P, Hastie ND.** The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15 Spec No 2:R196-201.
- Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Yanagihara M, Tsuboi A, Kawakami M, Oji Y, Oka Y, Okabe M, Tan B, Sugiyama H, Weissman IL.** The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia* 2007;21(8):1783-91.
- Hosen N, Maeda T, Hashii Y, Tsuboi A, Nishida S, Nakata J, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H.** Wilms tumor 1 peptide vaccination after hematopoietic stem cell transplant in leukemia patients. *Stem Cell Investig.* 2016;3:90.
- Huff V.** Wilms tumor genetics. *Am. J. Med. Genet.* 1998;79(4):260-7
- Hutson JM, Grover SR, O'Connell M, Pennell SD.** Malformation syndromes associated with disorders of sex development. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;10(8):476-87.
- Ijpenberg A, Pérez-Pomares JM, Guadix JA, Carmona R, Portillo-Sánchez V, Macías D, Hohenstein P, Miles CM, Hastie ND, Muñoz-Chápuli R.** Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev. Biol.* 2007;312:157-70.
- Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H.** Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor

- cells. *Blood* 1998;91(8):2969-76.
- Jaster R, Hilgendorf I, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S.** Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochem. Pharmacol.* 2003;66(4):633-41.
- Jensen JN¹, Cameron E, Garay MV, Starkey TW, Gianani R, Jensen J.** Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 2005;128(3):728-41.
- Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC.** Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010;464:606–609.
- Karl J, Capel B.** Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 1998;203:323-33.
- Kawaguchi M, Bader DM, Wilm B.** Serosal mesothelium retains vasculogenic potential. *Dev. Dyn.* 2007;236:2973–2979.
- Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD.** Primary contribution to zebrafish heart regeneration by GATA4(fl) cardiomyocytes. *Nature* 2010;464:601–605.
- Kim SK, MacDonald RJ.** Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002;12:540-7.
- Kim SK, Hebrok M.** Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 2001;15:111–127.
- Kispert A, Vainio S, McMahon AP.** Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 1998;125:4225–4234.
- Kiyozuka Y, Miyazaki H, Yoshizawa K, Senzaki H, Yamamoto D, Inoue K, Bessho K, Okubo Y, Kusumoto K, Tsubura A.** An autopsy case of malignant mesothelioma with osseous and cartilaginous differentiation: bone morphogenetic protein-2 in mesothelial cells and its tumor. *Dig. Dis. Sci.* 1999;44:1626–1631.
- Koido S, Okamoto M, Shimodaira S, Sugiyama H.** Wilms' tumor 1 (WT1)-targeted cancer vaccines to extend survival for patients with pancreatic cancer. *Immunotherapy* 2016;8(11):1309-1320.

- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R.** WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993. 74:679–691.
- Kubalak SW, Sucov HM.** Retinoids in Heart Development. In: Harvey RP and Rosenthal N, editors. *Heart Development*, San Diego: Academic Press; 1999, p. 209-19.
- Kurpios NA, Ibañez M, Davis NM, Lui W, Katz T, Martin JF, Izpisua-Belmonte JC, Tabin CJ.** The direction of gut looping is established by changes in the extracellular matrix and in cell:cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008;105:8499-506.
- Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Miyabayashi K, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Sugimoto Y, Okuno Y, Kodama R, Izuka-Kogo A, Senda T, Sasaoka T, Kitamura K, Aizawa S, and Morohashi K.** Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads. *Endocrinology* 2010;151:5893–904.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R.** Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014;5:178–196.
- Larsen HL, Grapin-Botton A.** The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2017;66:51-68.
- Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, Ornitz DM.** Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev. Cell* 2005;8:85-95.
- Li P, Cavallero S, Gu Y, Chen TH, Hughes J, Hassan AB, Brüning JC, Pashmforoush M, Sucov HM.** IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development. *Development* 2011;138:1795-805.
- Limana F, Capogrossi MC, Germani A.** The epicardium in cardiac repair: from the stem cell view. *Pharmacol. Ther.* 2011;129:82-96.
- Liu Q, Huang X, Oh JH, Lin RZ, Duan S, Yu Y, Yang R, Qiu J, Melero-Martin JM, Pu WT, Zhou B.** Epicardium-to-fat transition in injured heart. *Cell Res.* 2014;24:1367-9
- Loeb DM1, Summers JL, Burwell EA, Korz D, Friedman AD, Sukumar S.** An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic

- differentiation. *Leukemia* 2003;17:965-71.
- Lucini C, Castaldo L, Lai O, De Vico G.** Ontogeny, postnatal development and ageing of endocrine pancreas in *Bubalus bubalis*. *J. Anat.* 1998;192:417-24.
- Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV.** Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 2000;127:3057–3067.
- Manner J, Pérez-Pomares JM, Macías D, Muñoz-Chápuli R.** The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 2001;169:89–103.
- Manohar M, Verma AK, Venkateshaiah SU, Sanders NL, Mishra A.** Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 2017;8: 10-25.
- Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH.** Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:5037–5042.
- Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, Hall E, Reichmann J, Devenney PS, Hohenstein P, Hosen N, Hill RE, Muñoz-Chápuli R, Hastie ND.** Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat. Genet.* 2010;42:89–93.
- Masamune A, Shimosegawa T.** Pancreatic stellate cells: A dynamic player of the intercellular communication in pancreatic cancer. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015;1:S98-103. doi: 10.1016/j.clinre.2015.05.018.
- Masamune A, Shimosegawa T.** Pancreatic stellate cells--multi-functional cells in the pancreas. *Pancreatol.* 2013;13:102-5. doi: 10.1016/j.pan.2012.12.058.
- Masamune A, Shimosegawa T.** Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J. Gastroenterol.* 2009;44:249-60. doi: 10.1007/s00535-009-0013-2.
- McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV.** Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 2006;55:79-89.
- Means AL.** Pancreatic stellate cells: small cells with a big role in tissue homeostasis. *Lab. Invest.* 2013;93:4-7. doi: 10.1038/labinvest.2012.161.
- Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, Reinhardt R, Thiel E.** Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear

- protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995;9(6):1060-7.
- Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, Burch J, Kubalak SW, Kaliman P, Izpisua Belmonte JC, Chien KR, Ruiz-Lozano P.** Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:18455–18460.
- Moore AW, Schedl A, McInnes L, Doyle M, Hecksher-Sorensen J, Hastie ND.** YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech. Dev.* 1998;79:169-84.
- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A.** YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 1999;126(9):1845-57.
- Morales AV, Acloque H, Ocaña OH, de Frutos CA, Gold V, Nieto MA.** Snail genes at the crossroads of symmetric and asymmetric processes in the developing mesoderm. *EMBO Rep.* 2007;8:104-9.
- Mork L, Maatouk DM, McMahon JA, Guo JJ, Zhang P, McMahon AP, Capel B.** Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice. *Biol. Reprod.* 2012;86:37.
- Murtaugh LC, Keefe MD.** Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu. Rev. Physiol.* 2015;77:229-49
- Mutsaers SE, Wilkosz S.** Structure and function of mesothelial cells. *Cancer Treat. Res.* 2007;34:1–19.
- Mutsaers SE, Prêle CM, Pengelly S, Herrick SE.** Mesothelial cells and peritoneal homeostasis. *Fertil. Steril.* 2016;106:1018-24.
- Nagalakshmi VK, Yu J.** The ureteric bud epithelium: morphogenesis and roles in metanephric kidney patterning. *Mol. Reprod. Dev.* 2015;82(3):151-66.
- Nakaya Y, Sheng G.** Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev. Growth Differ.* 2008;50:755-66.
- Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G.** RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:765-75.

- Nerurkar NL, Mahadevan L, Tabin CJ.** BMP signaling controls buckling forces to modulate looping morphogenesis of the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017;114:2277-82.
- Nieto MA, Cano A.** The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 2012;22:361-8.
- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP.** EMT: 2016. *Cell* 2016;166:21-45.
- Norden J, Grieskamp T, Lausch E, van Wijk B, van den Hoff MJ, Englert C, Petry M, Mommersteeg MT, Christoffels VM, Niederreither K, Kispert A.** Wt1 and retinoic acid signaling in the subcoelomic mesenchyme control the development of the pleuropericardial membranes and the sinus horns. *Circ. Res.* 2010;106:1212-20.
- Ocaña OH, Coskun H, Minguillón C, Murawala P, Tanaka EM, Galcerán J, Muñoz-Chápuli R, Nieto MA.** A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature* 2017;549:86-90.
- Ohta S, Schoenwolf GC, Yamada G.** The cessation of gastrulation: BMP signaling and EMT during and at the end of gastrulation. *Cell Adh. Migr.* 2010;4:440-6.
- Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ.** The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* 2007;117(1):50-9.
- Onitsuka I, Tanaka M, Miyajima A.** Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* 2010;138:1525-35.
- Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL.** Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005;307:1603-9.
- Pan FC, Wright C.** Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev. Dyn.* 2011;240:530-65.
- Pandol, SJ.** *The Exocrine Pancreas.* Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael, 2010.
- Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Macías D, Guadix JA, Muñoz-Chápuli R.** Contribution of mesothelium-derived cells to liver sinusoids in avian embryos. *Dev. Dyn.* 2004;229:465-74.
- Pérez-Pomares JM, Muñoz-Chápuli R.** Epithelial-mesenchymal transitions: a

- mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans. *Anat. Rec.* 2002;268:343-51.
- Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R.** Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev. Dyn.* 1997;210:96–105.
- Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R.** The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev. Biol.* 1998;200:57–68.
- Pérez-Pomares JM, Macías-López D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R.** Immunohistochemical evidence for a mesothelial contribution to the ventral wall of the avian aorta. *Histochem. J.* 1999;31:771–779.
- Phillips PA, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, Warren A, Xu Z, Guilhaus M, Pirola R, Apte MV, Wilson JS.** Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107:17397-402. doi: 10.1073/pnas.1000359107.
- Plageman TF Jr, Zacharias AL, Gage PJ, Lang RA.** Shroom3 and a Pitx2-N-cadherin pathway function cooperatively to generate asymmetric cell shape changes during gut morphogenesis. *Dev. Biol.* 2011;357:227-34.
- Que J, Wilm B, Hasegawa H, Wang F, Bader D, Hogan BL.** Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008;105:16626–30.
- Rackley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BR.** Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth. Differ.* 1993. Dec;4(12):1023-31.
- Rawlins EL.** The building blocks of mammalian lung development. *Dev. Dyn.* 2011;240:463–476.
- Rinkevich Y, Mori T, Sahoo D, Xu PX, Bermingham JR Jr, Weissman IL.** Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nat. Cell. Biol.* 2012;14:1251–1260.
- Riopel MM, Li J, Liu S, Leask A, Wang R.** $\beta 1$ integrin-extracellular matrix interactions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function. *Lab.*

- Invest. 2013;93:31-40. doi: 10.1038/labinvest.2012.147.
- Rhoades RA, Bell DR.** Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine. Bell, 2012, p. 649.
- Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL.** Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. Development 2005;132:3405–3417.
- Rudat C, Kispert A.** Wt1 and Epicardial Fate Mapping. Circ. Res. 2012;111:165–69.
- Ruiz-Villalba A, Pérez-Pomares JM.** The expanding role of the epicardium and epicardial-derived cells in cardiac development and disease. Curr. Opin. Pediatr. 2012. 24:569–576.
- Shaw G, Renfree MB.** Wolffian duct development. Sex. Dev. 2014;8:273–280.
- Schnerwitzki D, Perry S, Ivanova A, Caixeta FV, Cramer P, Günther S, Weber K, Tafreshiha A, Becker L, Vargas Panesso IL, Klopstock T, Hrabe de Angelis M, Schmidt M, Kullander K, Englert C.** Neuron-specific inactivation of Wt1 alters locomotion in mice and changes interneuron composition in the spinal cord. Life Sci. Alliance. 2018 16;1(4):e201800106.
- Scholz H, Kirschner KM.** A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. Physiology (Bethesda). 2005;20:54-9.
- Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriack H, Collisson EA, Connor F, Van Dyke T, Kozlov S, Martin P, Tseng TW, Dawson DW, Donahue TR, Masamune A, Shimosegawa T, Apte MV, Wilson JS, Ng B, Lau SL, Gunton JE, Wahl GM, Hunter T, Drebin JA, O'Dwyer PJ, Liddle C, Tuveson DA, Downes M, Evans RM.** Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. Cell 2014;159:80-93. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.007.
- Schmidt C, Christ B, Patel K, Brand-Saberi B.** Experimental induction of BMP-4 expression leads to apoptosis in the paraxial and lateral plate mesoderm. Dev. Biol. 1998;202:253-63.
- Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA.** Organogenesis and development of the liver. Dev. Cell. 2010;18:175–189.

- Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M.** Pancreatic islet plasticity Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2010;2:135-45.
- Tahara J, Shimizu K, Shiratori K.** Engulfment of necrotic acinar cells by pancreatic stellate cells inhibits pancreatic fibrogenesis. *Pancreas* 2008;37:69-74. doi: 10.1097/MPA.0b013e318160a5cb.
- Takahashi Y, Sato Y, Suetsugu R, Nakaya Y.** Mesenchymal-to-epithelial transition during somitic segmentation: a novel approach to studying the roles of Rho family GTPases in morphogenesis. *Cells Tissues Organs* 2005;179:36-42.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.** Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-90.
- Thomason RT, Bader DM, Winters NI.** Comprehensive timeline of mesodermal development in the quail small intestine. *Dev. Dyn.* 2012;241:1678-94. doi: 10.1002/dvdy.23855.
- Toska E, Roberts SG.** Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem. J.* 2014;461(1):15-32.
- Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H, Elisseeva OA, Tamaki H, Oji Y, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Kishimoto T, Sugiyama H.** Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Leuk. Res.* 1999;23(5):499-505.
- Van Driessche A1, Berneman ZN, Van Tendeloo VF.** Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical. *Oncologist* 2012;17:250-9. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0240.
- Van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, van der Velde-van Dijke I, Pijnappels DA, Bax NA, Knaefan-Shanzer S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, van der Laarse A, van der Wall EE, Schalij MJ, de Vries AA.** Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:271–278.
- Villa Del Campo C, Lioux G, Carmona R, Sierra R, Muñoz-Chápuli R, Clavería C, Torres M.** Myc overexpression enhances of epicardial contribution to the developing heart and promotes extensive expansion of the cardiomyocyte population. *Sci. Rep.* 2016;6:35366.

- Von Gise A, Zhou B, Honor LB, Ma Q, Petryk A, Pu WT.** WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through b-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev. Biol.* 2011;356:421–431.
- Vonlaufen A, Phillips PA, Yang L, Xu Z, Fiala-Beer E, Zhang X, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV.** Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: a promising in vitro tool for studies of human pancreatic stellate cell biology. *Pancreatology* 2010;10:434-43. doi: 10.1159/000260900.
- Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, Apte MV.** Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology* 2007;133:1293-303.
- Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Poelmann RE.** Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat. Embryol. (Berl)* 1999;199:367–378.
- Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM.** Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. *Circ. Res.* 2003. 92:525–531.
- Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A, Englert C, Scholz H.** The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J.* 2002;21(6):1398-405.
- Wagner N, Wagner KD, Hammes A, Kirschner KM, Vidal VP, Schedl A, Scholz H.** A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. *Development* 2005;132(6):1327-36.
- Wake K.** "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* 1971;132:429-62.
- Wang J, Karra R, Dickson AL, Poss KD.** Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration. *Dev. Biol.* 2013;382:427–435.
- Wang XN, Li ZS, Ren Y, Jiang T, Wang YQ, Chen M, Zhang J, Hao JX, Wang YB, Sha RN, Huang Y, Liu X, Hu JC, Sun GQ, Li HG, Xiong CL, Xie J, Jiang ZM, Cai ZM, Wang J, Wang J, Huff V, Gui YT, Gao F.** The Wilms tumor gene, Wt1, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans. *PLoS Genet.*

2013;9(8):e1003645. doi: 10.1371/journal.pgen.1003645.

Weaver M, Batts L, Hogan BL. Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. *Dev. Biol.* 2003;258:169–84.

Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000;127:1563–1572.

Wen Q, Zheng QS, Li XX, Hu ZY, Gao F, Cheng CY, Liu YX. Wt1 dictates the fate of fetal and adult Leydig cells during development in the mouse testis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014 Dec 15;307(12):E1131-43. doi: 10.1152/ajpendo.00425.2014.

Wessels A, van den Hoff MJ, Adamo RF, Phelps AL, Lockhart MM, Sauls K, Briggs LE, Norris RA, van Wijk B, Pérez-Pomares JM, Dettman RW, Burch JB. Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Dev. Biol.* 2012;366:111–124.

White AC, Xu J, Yin Y, Smith C, Schmid G, Ornitz DM. FGF9 and SHH signaling coordinate lung growth and development through regulation of distinct mesenchymal domains. *Development* 2006;133:1507-17.

Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* 2005;132:5317-28.

Wilm B, Muñoz-Chápuli R. The Role of WT1 in Embryonic Development and Normal Organ Homeostasis. *Methods Mol. Biol.* 2016;1467, 23-39.

Wilm B, Muñoz-Chápuli R. Tools and Techniques for Wt1-Based Lineage Tracing. *Methods Mol. Biol.* 2016;1467:41-59.

Winters NI, Thomason RT, Bader DM. Identification of a novel developmental mechanism in the generation of mesothelia. *Development* 2012;139:1–9.

Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 2003;63:1530–1539.

Yáñez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan J A, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Álvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *New. Engl. J. Med.* 2003;348:403–13.

- Yousem SA, Hochholzer L.** Malignant mesotheliomas with osseous and cartilaginous differentiation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987;111:62–66.
- Zang G, Sandberg M, Carlsson PO, Welsh N, Jansson L, Barbu A.** Activated pancreatic stellate cells can impair pancreatic islet function in mice. *Ups. J. Med. Sci.* 2015;120:169–180. doi: 10.3109/03009734.2015. 1032453
- Zaret KS.** Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3:499–512.
- Zha M, Li F, Xu W, Chen B, Sun Z.** Isolation and characterization of islet stellate cells in rat. *Islets* 2014;6:e28701.
- Zheng QS, Wang XN, Wen Q, Zhang Y, Chen SR, Zhang J, Li XX, Sha RN, Hu ZY, Gao F, Liu YX.** Wt1 deficiency causes undifferentiated spermatogonia accumulation and meiotic progression disruption in neonatal mice. *Reproduction* 2013;147:45-52. doi: 10.1530/REP-13-0299.
- Zhou B, Pu WT.** Genetic Cre-loxP assessment of epicardial cell fate using Wt1-driven Cre alleles. *Circ. Res.* 2012;111:276–80.
- Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh JH, Butterfield C, Lin RZ, Melero-Martin JM, Dolmatova E, Duffy HS, von Gise A, Zhou P, Hu YW, Wang G, Zhang B, Wang L, Hall JL, Moses MA, McGowan FX, Pu WT.** Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J. Clin. Invest.* 2011;121:1894–1904.
- Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR, Pu WT.** Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008;454:109-13.